

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



**Prioritätsbescheinigung
DE 101 02 977.2
über die Einreichung einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 101 02 977.2

Anmeldetag: 23. Januar 2001

Anmelder/Inhaber: Professor Dr. Thomas Jentsch ,
20146 Hamburg/DE

Bezeichnung: Testsystem zur Entwicklung von Therapeutika,
insbesondere von Wirkstoffen zur Behandlung von
Osteoporose

IPC: C 07 H 21/00, C 07 K 14/705, C 12 N 5/16,
C 12 Q 1/68, A 61 K 45/00, A 61 P 25/00,
A 61 P 19/10

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der am 23. Januar 2001 eingereichten Unterlagen dieser Patentanmeldung, hinterlegt mit dem Prioritätsbeleg vom 06. Februar 2002 bei der World Intellectual Property Organization.

München, den 31. März 2009
Deutsches Patent- und Markenamt
Die Präsidentin

Im Auftrag

Riester

UEXKÜLL & STOLBERG

PATENTANWÄLTE

BESELERSTRASSE 4
D - 22607 HAMBURG

Prof. Dr. Thomas Jentsch
Laufgraben 33

20146 Hamburg

EUROPEAN PATENT ATTORNEYS
EUROPEAN TRADEMARK ATTORNEYS

DR. J.-D. FRHR. von UEXKÜLL (- 1992)
DR. ULRICH GRAF STOLBERG (- 1998)
DIPL.-ING. JÜRGEN SUCHANTKE
DIPL.-ING. ARNULF HUBER
DR. ALLARD von KAMEKE
DIPL.-BIOL. INGEBORG VOELKER
DR. PETER FRANCK
DR. GEORG BOTH
DR. ULRICH-MARIA GROSS
DR. HELMUT von HEESCH
DR. JOHANNES AHME
DR. HEINZ-PETER MUTH
DIPL.-ING. LARS MANKE
DR. MARTIN WEBER-QUITZAU
DR. BERND JANSSEN
DR. ALBRECHT von MENGES

RECHTSANWALT
EUROPEAN TRADEMARK ATTORNEY
DR. FRANK DETTMANN

23. Januar 2001
(P 56405 WE/aw)

**Testsystem zur Entwicklung von Therapeutika, insbesondere
von Wirkstoffen zur Behandlung von Osteoporose**

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Testsystem zur Identifizierung und zum Testen von Wirkstoffen, die auf die synaptische Transmission wirken (Wirkstoffe zur Behandlung neuronaler Erkrankungen), die die Endo-/Exozytose beeinflussen, die die Prozessierung von Proteinen beeinflussen und insbesondere von Wirkstoffen, die zur Behandlung der Osteoporose oder des Morbus Paget, zur Behandlung neurologischer und neuromuskulärer Erkrankungen sowie anderer Nervenkrankheiten oder als Psychopharmaka verwendet werden können. Gegenstand der Erfindung ist ferner ein nicht-menschlicher Säuger, vorzugsweise ein Nager, bei dem ein oder mehrere Chloridkanäle aus der Gruppe bestehend aus ClC-3, ClC-4, ClC-6 und ClC-7 nicht oder nicht-funktionell exprimiert werden, sowie somatische Zelllinien, die beispielsweise von einem solchen Tier abgeleitet sind, sowie deren Verwendung zum Identifizieren und Testen von Substanzen, die geeignet sind, Chloridkanäle, insbesondere ClC-3, ClC-4, ClC-5, ClC-6 und/oder

ClC-7, in ihrer Aktivität zu beeinflussen, insbesondere zu inhibieren oder zu aktivieren.

Die Osteoporose stellt eine Erkrankung dar, bei der es zum verstärkten Abbau von Knochen kommt, der zur Fragilität führt. Osteoporose ist bei älteren Menschen, insbesondere (hormonell bedingt) bei älteren Frauen, stark verbreitet. Aus diesem Grund werden älteren weiblichen Patienten häufig Sexualhormone verabreicht, die den Prozeß des Knochenabbaus zwar stoppen können, jedoch zum Teil schwerwiegende unerwünschte Nebenwirkungen haben. Spezifische Osteoporose-Medikamente sind bislang nicht entwickelt worden.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurde nunmehr überraschenderweise festgestellt, daß Mutationen der Nukleinsäuresequenz, die für das ClC-7 Protein (Chloridkanal ClC-7) kodiert und die Expression eines nicht-funktionellen Proteins bewirkt bzw. die Expression vollständig unterbindet, in Mäusen zu einer sehr schweren Form der Osteopetrose führt. Auf Basis dieser überraschenden Ergebnisse wurde festgestellt, daß auch Patienten mit schwerer juveniler Osteopetrose Mutationen im ClC-7 Gen aufweisen.

Bei dem Chloridkanal ClC-7 handelt es sich um einen vorwiegend intrazellulären, in späten Endosomen und Lysosomen vorkommenden Chloridkanal, der ubiquitär exprimiert ist und insbesondere auch in Osteoklasten, den knochenabbauenden Zellen, vorkommt. Mutationen, die die Expression eines nicht-funktionellen ClC-7 Proteins bewirken, oder eine Expression vollständig unterbinden (im folgenden "Knock-Out" oder "KO" genannt) verhindern, daß Osteoklasten den Knochen abbauen können. Genauere Untersuchungen haben ergeben, daß ClC-7, der zusammen mit der Protonenpumpe in die sogenannte "Ruffled Border" eingebaut wird, die die Resorptionslakune begrenzt und über die Säureäquivalente in die Resorptionslakune transportiert werden, durch eine Chloridleitfähigkeit den elektroneutralen Transport von HCl in die Lakune gewährleistet. Ein saurer pH-Wert in der Lakune ist essentiell für den Knochen-

abbau. Fehlt eine entsprechende Chloridleitfähigkeit, kann die Protonenpumpe nicht effektiv pumpen, mit der Folge, daß Osteoklasten die Resorptionslakune nicht ansäuern und den Knochen nicht abbauen können.

Durch den Knock-Out von ClC-7 kommt es ferner zu einer starken Retinadegeneration, und es wird ferner eine Neurodegeneration im zentralen Nervensystem (ZNS) beobachtet. Diese Beobachtungen können darauf zurückgeführt werden, daß die spät-endosomale und lysosomale Ansäuerung und Degradation durch den ClC-7 Knock-Out in vielen Geweben gestört ist.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurde ebenfalls festgestellt, daß Chloridkanäle der CLC Genfamilie auch an der Ansäuerung synaptischer Vesikel beteiligt sind. Dies wurde beispielsweise durch den Knock-out des ClC-3 Kanals gezeigt. Bei diesem Knock-out kommt es zu Veränderungen der synaptischen Transmission im Zentralnervensystem und zu einer neuronalen Degeneration. Es wurde ferner festgestellt, daß auch andere CLC Kanäle, wie ClC-4 und ClC-7, in synaptischen Vesikeln vorkommen. Synaptische Vesikel nehmen Neurotransmitter auf, die sie über Exozytose in den synaptischen Spalt abgeben und damit die nachgeschaltete Nervenzelle modulieren (erregen oder inhibieren). Die Aufnahme von Neurotransmittern in synaptische Vesikel wird von dem pH-Gradienten und Potentialgradienten über die Membran der synaptischen Vesikel getrieben (vgl. Literaturzitate (62)-(67)), so daß die Aktivität von Chloridkanälen in synaptischen Vesikeln die Signaltransduktion im Nervensystem beeinflusst.

Durch die Untersuchungen, die im Rahmen der vorliegenden Erfindung angestellt wurden, ist es nunmehr möglich, ein Testsystem zur Verfügung zu stellen, das die Identifizierung und das Testen von Substanzen ermöglicht, die geeignet sind, einen oder mehrere Chloridkanäle aus der Gruppe bestehend aus ClC-1, ClC-2, ClC-Ka, ClC-Kb, ClC-3, ClC-4, ClC-5, ClC-6 und/oder ClC-7 - insbesondere die vorwiegend intrazellulären Chloridkanäle ClC-3, ClC-4, ClC-5, ClC-6 und/oder ClC-7 - zu inhibieren oder anderweitig in der

Aktivität zu beeinflussen, d.h. beispielsweise zu aktivieren oder ihre Regulation zu verändern. Insbesondere wird erstmals ein Testsystem und ein Verfahren zum Identifizieren und Testen von Substanzen bereitgestellt, die den Chloridkanal ClC-7 (ganz oder teilweise) inhibieren, insbesondere von Substanzen, die zur Behandlung von Osteoporose oder von Morbus Paget geeignet sind. Ein derartiges Testsystem erlaubt auch die Identifikation von Substanzen, die die neuronale Signaltransduktion beeinflussen und daher zur Behandlung neuronaler Erkrankungen geeignet sind.

Der Erfindung liegt die Überlegung zugrunde, daß eine (partielle) Inhibition des ClC-7 Chloridkanals die Osteoklastenfunktion hemmt und damit dem Knochenabbau entgegenwirkt. An ähnlichen Ansätzen wird in der pharmazeutischen Industrie geforscht, wo nach effektiven Inhibitoren der Protonenpumpe gesucht wird. Durch die vorliegenden Erkenntnisse ist es nunmehr erstmals möglich, Substanzen zu identifizieren, die spezifisch auf den ClC-7 Chloridkanal wirken und eine partielle oder vollständige Inhibition bewirken oder den Kanal aktivieren bzw. dessen Regulation verändern. Das Problem, daß ein totaler KO auch andere Gewebe beeinflußt und z.B. eine Retinadegeneration und eine Degeneration des ZNS verursacht und daher auch eine pharmakologische Inhibition von ClC-7 (d.h. durch Verabreichung von ClC-7-Inhibitoren) ähnliche Effekte haben könnte, kann einerseits dadurch gelöst werden, daß man eine nur partielle Inhibition des Kanals bewirkt, und andererseits dadurch, daß man Wirkstoffe oder Pharmaka verwendet, die diese Organe (z.B. aufgrund der Blut-Hirn-Schranke) nicht in genügend hoher Konzentration erreichen.

Der Erfindung liegt weiterhin die Überlegung zugrunde, daß durch eine Inhibition oder Stimulation von Chloridkanälen synaptischer Vesikel die synaptische Übertragung im Nervensystem beeinflußt werden kann. Eingriffe in die synaptische Transmission sind ein vielbenutztes Prinzip der Pharmakologie zur Behandlung neurologischer und neuromuskulärer Erkrankungen. So werden z.B. Substanzen eingesetzt, die die entsprechenden Aufnahmetransporter in synaptischen Vesikeln beeinflussen, oder die die Wiederauf-

nahme des ausgeschütteten Neurotransmitters aus dem Extrazellulärraum in die Zelle beeinflussen. Die Aufnahme der Neurotransmitter in synaptische Vesikel erfolgt über in deren Membran lokalisierte Transporter, die i.A. an den elektrochemischen Gradienten für Protonen über die Vesikelmembran gekoppelt und getrieben wird (vgl. Publikationen (81) und (82)). Verändert man diesen Gradienten, so kann man die Aufnahme von Transmittern teilweise differentiell verändern. Einerseits sind möglicherweise bestimmte CLC Kanäle nur in bestimmten Subpopulationen von Nervenzellen oder synaptischen Vesikeln (z.B. für bestimmte Neurotransmitter) vorhanden, andererseits besteht der elektrochemische Gradient für Protonen aus zwei Komponenten (ΔpH und $\Delta\psi$), an den die verschiedenen Transporter verschieden gekoppelt sind. So wird die Aufnahme von Azetylcholin hauptsächlich über den pH-Gradienten getrieben, während die Aufnahme von Glutamat hauptsächlich von der elektrischen Spannung $\Delta\psi$ getrieben wird.

Der elektrochemische Gradient für Protonen in synaptischen Vesikeln wird von der Protonenpumpe im Zusammenspiel mit Chloridkanälen aufgebaut. Die Anwesenheit einer Chloridleitfähigkeit verringert den elektrischen Anteil $\Delta\psi$ des Gradienten und erhöht den ΔpH -Anteil. Eine Inhibition eines Chloridkanals in synaptischen Vesikeln verringert also ΔpH , erhöht jedoch $\Delta\psi$; dadurch wird z.B. die Aufnahme von Azetylcholin verringert, die Aufnahme von Glutamat jedoch erhöht, vorausgesetzt, der Kanal kommt auf beiden Vesikeltypen vor. Gemäß einer besonderen Ausführungsform kann umgekehrt auch eine spezifische Stimulation von einzelnen Chloridkanälen erfolgen. Dies hat z.B. eine Verringerung der Glutamataufnahme und eine Erhöhung der Azetylcholinaufnahme zur Folge.

Neben der Möglichkeit, die Konzentration von Neurotransmittern in synaptischen Vesikeln zu modulieren, können derartige Substanzen auch den Transport der Vesikel innerhalb der Zelle, z.B. auch die Endo- und Exozytose, beeinflussen. Dies folgt aus der Beobachtung, daß beim Knock-out des ClC-5 das endozytotische Trafficking beeinflusst wird (stark verringert ist; vgl. (8)),

sowie daraus, daß der endozytotische und exozytotische Weg durch Verminderung des vesikulären pH-Wertes erheblich gestört werden kann (vgl. Publikationen (69) bis (74)).

Substanzen, die die Aktivität der vorwiegend intrazellulär vorkommenden CLC Chloridkanäle ClC-3, ClC-4, ClC-6 und/oder ClC-7 beeinflussen und insbesondere inhibieren, sind somit als Therapeutika für neurologische und neuromuskuläre Erkrankungen sowie anderen Nervenkrankheiten und, im Falle von ClC-7, für Osteoporose, Morbus Paget, und andere knochenabbauende Krankheiten geeignet. Im Rahmen der Erfindung werden daher diese Kanalproteine als Zielmoleküle benutzt, um Substanzen für die Behandlung dieser Krankheiten zu finden und weiterzuentwickeln.

Als Methoden zum Auffinden und Testen dieser Substanzen kommen mehrere Methoden in Betracht. Gemäß einer Ausführungsform der Erfindung wird die Bindung der Substanzen an das Zielmolekül durch dem Fachmann gut bekannte Methoden getestet. Dazu werden die Kanalproteine z.B. von Bakterien, Hefen, oder Säugetierzellen heterolog exprimiert und gereinigt. Entsprechende Verfahren sind dem Fachmann wohlbekannt. Die Bindung der Substanzen an die Proteine kann in einer bevorzugten Ausführung der Erfindung über gut bekannte Methoden der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie und Fluoreszenz-Intensitätsverteilungsanalyse (vgl. Referenzen (85) bis (88)) erfolgen. In einer anderen bevorzugten Ausführung erfolgt die Messung über ebenfalls gut bekannte Methoden der Plasmonenresonanzmessung (vgl. Referenzen (89) bis (94)).

Eine weitere bevorzugte Methode dieser Erfindung zur Identifizierung von Substanzen, die auf die Chloridkanäle ClC-3, ClC-4, ClC-6 und/oder ClC-7 wirken, sind Testsysteme, in denen das entsprechende Kanalprotein funktionell exprimiert wird, die anderen Kanalprotein jedoch entweder weniger oder gar nicht vorhanden sind. Derartige Systeme sind auch zum Testen der bei den obigen Bindungsverfahren gefundenen Substanzen auf funktionelle Effekte sinnvoll. In diesem Fall erfolgt die Messung über die Funktion des Kanalproteins, das in bestimmten Systemen entweder Ströme,

Spannungen, oder pH-Werte ändert, die dann entweder direkt gemessen werden oder deren Effekt auf Detektionssysteme gemessen wird.

In einer bevorzugten Ausführung der Erfindung wird die Wirksamkeit der Substanz auf einen Kanal ClC-x (x=3, 4, 6 oder 7) an Zellen oder davon abgeleiteten Präparaten (wie Membranpräparationen oder Vesikel) gemessen, die ausschließlich oder vorzugsweise (überwiegend) nur den Kanal ClC-x exprimieren (z.B. bei der Suche nach Osteoporose-Medikamenten ClC-7).

Die Spezifität wird dadurch getestet, daß man die Wirksamkeit von Testsubstanzen beispielsweise an Zellen mißt, die ausschließlich oder vorzugsweise (überwiegend) nur den ClC-7 Kanal exprimieren. Diese Zellen bzw. Zelllinien erhält man beispielsweise durch Isolierung aus nicht-menschlichen Säugern, vorzugsweise Nagern (insbesondere Mäusen), deren Keimzellen und somatischen Zellen für Chloridkanäle kodierenden Nukleinsäuresequenzen enthalten, bei denen möglichst viele der für die Chloridkanäle kodierenden Nukleinsäuresequenzen - mit Ausnahme des Chloridkanals für den ein spezifischer Inhibitor gesucht wird - durch Mutation, Trunkation, vollständige Deletion und/oder teilweise Deletion so verändert ist, daß die jeweiligen Chloridkanäle nicht oder nicht funktionell exprimiert werden. Nicht funktionell bedeutet in diesem Zusammenhang, daß das Protein des Chloridkanals so exprimiert wird, daß die Transportfunktion des Chloridkanals vermindert oder ganz unterbunden ist. Diese genetischen oder gentechnischen Veränderungen werden auch als Knock-out bezeichnet. Entsprechende genetisch veränderte Mäuse (als Beispiel für nichtmenschliche Säuger) werden auch als Knock-out Mäuse oder KO Mäuse bezeichnet. Als Knock-out des ClC-1 Kanals existieren beispielsweise natürliche Mutanten bei der Maus und dem Menschen, d.h., eine nicht-funktionelle oder fehlende Expression des ClC-1 Kanals kommt natürlicherweise bei einem gewissen Prozentsatz der Population vor, was zur Myotonia Congenita führt. Bei einem Knock-out des ClC-K1-Kanals oder des ClC-KB-Kanals kommt es zu

diabetes insipidus (bei der Maus) bzw. zum Bartter-Syndrom (beim Menschen). Ein Knock-out von ClC-5 führt zur Dent-Erkrankung.

Selbstverständlich kann die Spezifität auch durch andere Methoden gemessen werden, beispielsweise am isolierten Kanalprotein, das z.B. durch Überexpression erhältlich ist. Entsprechende Verfahren zur Klonierung und Expression der für das entsprechende Kanalprotein kodierenden Nukleinsäuresequenz sind dem Fachmann genauestens bekannt. Ferner kann die Spezifität auch direkt durch Verwendung geeigneter Assays, wie z.B. des "pit assay" (siehe unten) bestimmt werden, die dem Fachmann wohlbekannt sind.

Der experimentell erzeugte Knock-out von Ionenkanälen und insbesondere von Chloridkanälen ist dem Fachmann gut bekannt und beispielsweise in den im Anhang zitierten Publikationen (1) bis (8) beschrieben. Ferner ist bekannt, daß zahlreiche Veränderungen der für Chloridkanäle kodierenden Nukleinsäuresequenzen zur fehlenden oder nicht-funktionellen Expression der Proteine führen (vgl. Publikationen (9) bis (24)). Der allgemeine strukturelle Aufbau bzw. die Transmembran-Topologie der Chloridkanäle ist schematisch in Fig. 1 dargestellt. Beispielsweise führen bereits einzelne Punktmutationen in den Domänen der D3 bis D5 zu Störungen oder einem Ausfall der Expression bzw. zur Expression eines Proteins, das keine Chloridkanal-Eigenschaften aufweist. Der gleiche Effekt kann durch Trunkation im Bereich der Domänen D10 bis D12 erreicht werden bzw. allgemein durch Trunkation in Transmembran-spannenden Domänen. Selbstverständlich kann auch das Gen, d.h. die für den Chloridkanal kodierende Nukleinsäuresequenz vollständig deletiert werden oder durch eine für ein anderes Protein kodierende Nukleinsäuresequenz ersetzt werden, oder der die Genexpression steuernde Promotorbereich mutiert werden. Ziel der genetischen Veränderung ist es, die Protein-Expression zu unterbinden oder die nicht-funktionelle Expression des Proteins zu bewirken. Alternativ kommt auch ein sogenannter Knock-down in Betracht, bei dem die gentechnischen Veränderungen lediglich zu einer Einschränkung der Chloridkanal-Funktion führen, ohne die Transporteigenschaften ganz zu unterbinden. Derartige Knock-down

Strategien sind dem Fachmann wohlbekannt und schließen z.B. antisense Strategien oder Ribozymstrategien, d.h. Knock-down unter Verwendung von antisense-Oligonukleotiden und Ribozymen, ein, sind jedoch nicht auf diese beschränkt. Bei dem Knock-down zur Anwendung kommende Methoden sind in den im Anhang zitierten Publikationen (25) bis (36), auf die vorliegend ausdrücklich Bezug genommen wird, eingehender beschrieben.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung können sowohl somatische Zelllinien verwendet werden, die aus einem genetisch veränderten nicht-menschlichen Säuger (Nager, insbesondere Maus) hergestellt sind, als auch solche Zelllinien, bei denen die Expression der entsprechenden Kanäle ClCxxx nachträglich durch genomische Mutationen der somatischen Zelllinie heruntergesetzt oder abgeschafft wurde und/oder die Expression der Kanäle durch andere Verfahren wie z.B. über Anti-Sense Technologie oder Ribozymstrategien herunterreguliert werden. Diese Herabregulation oder Verminderung der Expression kann insbesondere auch induzierbar sein und damit Vitalitätsprobleme und andere Probleme, die beim Ausschalten mehrerer Chloridkanäle gleichzeitig entstehen können, verhindern oder abmildern. Diese Zelllinien können auch menschlichen Ursprungs sein.

Bei der Identifikation und beim Testen von Substanzen hinsichtlich ihrer Chloridkanal-spezifischen Wirkung geht man vorzugsweise von genetisch veränderten nicht-menschlichen Säugern oder von Zelllinien aus, bei denen vorzugsweise zwei oder drei Chloridkanäle nicht bzw. nicht-funktionell exprimiert werden. Im Falle des Chloridkanals ClC-7 darf die Expression dieses Chloridkanals nicht gestört sein, so daß ein Knock-Out oder Knock-down eines oder mehrerer anderer Chloridkanäle, beispielsweise aus der Gruppe bestehend aus ClC-3, ClC-4, ClC-5 und ClC-6, erfolgen muß. Entsprechendes gilt auch, wenn Substanzen identifiziert und getestet werden sollen, die auf einen anderen Kanal spezifisch wirken. So müßten für einen Test gegenüber ClC-4 z.B. Zelllinien etabliert werden, die nur den ClC-4-Kanal exprimieren. Das Testen der Substanzen kann entweder direkt an diesen Zellen erfolgen,

oder auch an von diesen Zellen gewonnenen Präparaten, wie z.B. Vesikeln, Membranpräparationen, insbesondere synaptischen Vesikelpräparationen, oder gereinigten Proteinen. Verfahren zur Isolierung dieser Präparate sind dem Fachmann wohlbekannt.

Die Spezifität der Wirkung gegen einen bestimmten ClC Chloridkanal wird dadurch getestet, daß man einerseits wie beschrieben zum Auffinden der Substanzen Zelllinien benutzt, die in den getesteten intrazellulären Kompartimenten hauptsächlich oder ausschliesslich nur diesen bestimmten Chloridkanal enthalten, oder man die oben genannten, davon abgeleiteten Präparate verwendet. Substanzen, die den erwarteten Effekt in diesen Zelllinien oder an davon abgeleiteten Präparaten aufweisen, werden sodann auf andere Zelllinien oder davon abgeleitete Präparate getestet, die diesen Kanal nicht besitzen. Wenn sie spezifisch sind, sollten sie auf diese Zelllinien keinen Effekt haben. Je nach Kanal schliessen sich spezifischere Assays an: Will man z.B. den Effekt auf den ClC-7 Kanal mit Hinsicht auf die Osteoporose testen, kann man kultivierte Wildtyp (WT) Osteoklasten in einem "pit-assay" (vgl. Publikationen (52) bis (58)) auf Dentin, Elfenbein, Knochen oder andere geeignete Substrate testen und beispielsweise die Bildung von Löchern im Substrat untersuchen oder die Azifidierung der Resorptionslakune mit Farbstoffen (z.B. Acridin Orange) untersuchen (vgl. Publikationen (59) bis (61)).

Zielt man auf die Inhibition von Chloridkanälen synaptischer Vesikel ab (wie z.B. ClC-3), so kann im nächsten Schritt die Azifidierung gereinigter synaptischer Vesikel in Suspension mit Farbstoffen gemessen werden (vgl. Publikationen (62) bis (64)). Eine Inhibition des Kanals sollte sich in einer Inhibition der Azifidierungsrate äussern, die Spezifität ist dadurch überprüfbar, daß man synaptische Vesikel aus der entsprechenden KO Maus isoliert, auf deren Azifidierungsrate die Substanz keinen Effekt haben sollte. In weitergehenden Schritten lässt sich die Spezifität auf bestimmte Typen von synaptischen Vesikel testen, indem man die Aufnahme von (z.B. radioaktiv markierten) Neurotransmittern in synaptische Vesikel in An- und Abwesenheit der

Substanz bestimmt. Die entsprechenden Methoden sind dem Fachmann wohlbekannt (vgl. z.B. Publikationen (65) bis (68)).

Somatische Zelllinien lassen sich aus verschiedenen Geweben der KO Mäuse gewinnen, wobei das Material möglichst steril gewonnen wird und entweder nativ oder preferentiell nach enzymatischem Verdau in entsprechende Zellkulturbehältnisse (z.B. Schalen) zusammen mit Nährmedien (z.B. Dulbecco's MEM, vorzugsweise zumindest anfänglich mit Antibiotikazusatz) gegeben und bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert wird. Die Zellen werden mit Standardtechniken der Zellkultur vermehrt, wobei gemäß einer besonderen Ausführungsform der Erfindung eine Immortalisierung der Zelllinie durch Transfektion mit entsprechenden Genen (z.B. SV40 largeT Antigen, oder Telomerase) erfolgt (vgl. Publikationen (37) bis (39)). Als Alternative kann man KO Mäuse mit einem Mausstamm kreuzen, der ein entsprechendes Immortalisierungsgen exprimiert (wie z.B. die Immorto-Maus, vgl. Publikationen (40) bis (42), aber auch andere Mäuse (vgl. Publikation (43)), die diese Gene eventuell unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotors exprimieren).

Im Besonderen kann man diese Zelllinien als Testsystem weiterentwickeln, indem man sie mit entsprechenden Konstrukten transfiziert, die Proteine exprimieren die direkt oder indirekt als Indikator für die Messmethode dienen. Beispielsweise können chimäre Proteine exprimiert werden, die aufgrund bestimmter Proteinsequenzsignale spezifisch in bestimmte Kompartimente gelenkt werden. Der andere Teil der Chimäre enthält entweder direkt ein entsprechendes Indikatorprotein (wie z.B. pH-sensitive fluoreszente Proteine wie bestimmte GFP Mutanten (vgl. Publikationen (44) bis (46)), oder Bindungsstellen, um Indikatorsubstanzen (wie z.B. Antikörper (vgl. Publikation (49)), Biotin-gekoppelte Farbstoffe (vgl. Publikation (47)) in diese Kompartimente zu lenken (vgl. (44) bis (51)).

Eine besondere Ausführungsform der Erfindung betrifft somit die Verwendung der oben genannten nicht-menschlichen Säuger oder

somatischer Zelllinien (menschlichen oder nicht-menschlichen Ursprungs) zur Identifizierung von Substanzen, die auf die synaptische Transmission wirken. Erstmals wird ein Testsystem und ein Verfahren zum Identifizieren und Testen von Substanzen bereitgestellt, die den Chloridkanal ClC-3, ClC-4, ClC-6 und/oder ClC-7 inhibieren oder anderweitig in der Aktivität beeinflussen (d.h. beispielsweise aktivieren oder seine/ihre Regulation verändern) insbesondere von Substanzen, die zur Behandlung neurologischer und neuromuskulärer Erkrankungen sowie anderer Nervenkrankheiten oder als Psychopharmaka geeignet sind.

Eine Abgrenzung von Osteoporose Wirkstoffen ist einmal dadurch gegeben, daß Osteoporose-Wirkstoffe eine Beeinflussung des ClC-7 betreffen müssen. Das heißt, daß zum Beispiel Wirkstoffe gegen ClC-3 (der auf synaptischen Vesikeln vorkommt) nicht mit der extrazellulären Azifidierung der Osteoklasten interferieren werden. Andererseits kann man gegebenenfalls Substanzen, die auf ClC-7 wirken, so modifizieren, daß sie die Blut-Hirn-Schranke nicht durchqueren und daher nicht im ZNS wirken können. Derartige Methoden sind dem Fachmann wohlbekannt. Es ist auch denkbar, daß Substanzen spezifisch in bestimmte Neuronengruppen gelenkt (gerichtet bzw. sortiert) werden (z.B. durch Bindung an spezifische Oberflächenrezeptoren), oder die Stoffe über in diesen Neuronen vorhandene spezifische enzymatische Aktivitäten erst zu der aktiven Substanz metabolisiert werden.

Ein Test der Spezifität kann, wie oben angegeben, einerseits anhand entsprechender Zelllinien durchgeführt werden, die nur bestimmte Kanaltypen exprimieren, an davon abgeleiteten Präparaten (siehe oben) oder in spezifischen Testsystemen, wie Osteoklasten in Kultur, oder an synaptischen Vesikelpräparationen aus WT und KO Tieren.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist insbesondere eine Nukleinsäuresequenz, die für ein Protein aus der Gruppe bestehend aus den Chloridkanälen ClC-3, ClC-4, ClC-6 und ClC-7 kodiert,

wobei die Nukleinsäuresequenz durch Mutation, Trunkation oder ganz oder teilweise Deletion verändert ist.

Ferner betrifft die Erfindung einen genetisch veränderten nicht-menschlicher Säuger, dessen Keimzellen und somatische Zellen für ein Protein aus der Gruppe bestehend aus den Chloridkanälen ClC-1, ClC-2, ClC-Ka, ClC-Kb, ClC-3, ClC-4, ClC-5, ClC-6 und/oder ClC-7 kodierende Nukleinsäuresequenzen enthalten, wobei die für ClC-3, ClC-4, ClC-6 und/oder ClC-7 kodierende(n) Nukleinsäuresequenz(en) (gegenüber der natürlicherweise vorkommenden Nukleinsäuresequenz) durch Mutation, Trunkation und/oder ganz oder teilweise Deletion verändert ist (sind).

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung enthält der genetisch veränderte, nicht-menschliche Säuger zusätzlich die für ClC-1, ClC-2, ClC-Ka, ClC-Kb und/oder ClC-5 kodierende(n) Nukleinsäuresequenz(en), die durch Mutation, Trunkation und/oder ganz oder teilweise Deletion verändert ist (sind).

Aus dem Säuger, der insbesondere ein Nager und besonders bevorzugt eine Maus ist, werden erfindungsgemäß somatische Zelllinien etabliert bzw. abgeleitet, die einen oder mehrere der Chloridkanäle aus der Gruppe bestehend aus ClC-1, ClC-2, ClC-Ka, ClC-Kb, ClC-3, ClC-4, ClC-5, ClC-6 und ClC-7 nicht exprimieren. Wie bereits beschrieben, ist es auch möglich, aus diesen nicht-menschlichen Säugern Präparate abzuleiten, wie z.B. Vesikel- und andere Membranpräparationen, im besonderen auch synaptische Vesikelpräparationen, die ein entsprechendes Expressionsmuster bezüglich der Chloridkanäle aufweisen und die daher ebenso geeignet sind wie die KO Tiere oder Zelllinien als solche.

Gegenstand der Erfindung sind ferner somatische Zelllinien, bei denen die Expression der Chloridkanäle ClC-1, ClC-2, ClC-Ka, ClC-Kb, ClC-3, ClC-4, ClC-5, ClC-6 und ClC-7, insbesondere aus der Gruppe bestehend aus ClC-3, ClC-4, ClC-6 und ClC-7, entweder durch genomische Mutationen der somatischen Zelllinie heruntergesetzt und/oder die Expression der Kanäle durch andere Verfahren

wie z.B. über Anti-Sense Technologie oder Ribozymstrategien herunterreguliert werden. Diese Herabregulation kann insbesondere auch induzierbar sein, um Probleme mit der Vitalität der Zellen und andere Probleme, die beim Ausschalten mehrerer Chloridkanäle gleichzeitig entstehen können, zu verhindern oder abzumildern.

Die o.g. Zelllinien können auch menschlichen Ursprungs sein.

Die Erfindung betrifft ferner die Verwendung eines genetisch veränderten, nicht-menschlichen Säugers, dessen Keim- und somatische Zellen für ein Protein aus der Gruppe bestehend aus den Chloridkanälen ClC-1, ClC-2, ClC-Ka, ClC-Kb, ClC-3, ClC-4, ClC-5, ClC-6 und/oder ClC-7 kodierende Nukleinsäuresequenzen enthalten, wobei eine oder mehrere dieser Nukleinsäuresequenzen (gegenüber der natürlicherweise vorkommenden Nukleinsäuresequenz) durch Mutation, Trunkation und/oder ganz oder teilweise Deletion verändert ist/sind, zum Identifizieren und Testen von Substanzen, die geeignet sind, einen oder mehrere der Chloridkanäle zu inhibieren.

Vorzugsweise werden Säuger verwendet, bei denen eine oder mehrere der für Proteine aus der Gruppe bestehend aus den Chloridkanälen ClC-1, ClC-2, ClC-Ka, ClC-Kb, ClC-3, ClC-4, ClC-5, ClC-6 und ClC-7 kodierenden Nukleinsäuresequenzen (gegenüber der natürlicherweise vorkommenden Nukleinsäuresequenz) durch Mutation, Trunkation und/oder ganz oder teilweise Deletion verändert ist, wobei jeweils eine der für ClC-7, ClC-3, ClC-4 oder ClC-6 kodierenden Sequenzen nicht verändert ist, so daß dieser Chloridkanal normal, d.h. funktionell exprimiert wird.

Anstelle der Säuger können auch die oben genannten Zelllinien (menschliche und nicht-menschliche) oder davon abgeleitete Präparate (siehe oben) verwendet werden.

Die Erfindung betrifft schließlich ein Verfahren zum Identifizieren und Testen von Substanzen, die geeignet sind, einen oder mehrere Chloridkanäle aus der Gruppe bestehend aus ClC-3, ClC-4,

ClC-6 und ClC-7 zu inhibieren oder anderweitig in seiner/ihrer Aktivität zu beeinflussen, d.h. beispielsweise zu aktivieren oder ihre Regulation zu verändern. Bei diesem Verfahren bestimmt man an Zelllinien bzw. Zellen (oder an davon abgeleiteten Präparaten, insbesondere Membranpräparationen, wie Vesikeln; siehe oben), die nur einen Chloridkanal aus der Gruppe bestehend aus ClC-3, ClC-4, ClC-6 und ClC-7 exprimieren, den luminalen pH-Wert der den Kanal exprimierenden Kompartimente und/oder die Spannung über die den Kanal umschliessende Membran. Anschließend bringt man diese Zelllinien bzw. Zellen mit den zu testenden Substanzen in Kontakt, und bestimmt erneut den luminalen pH-Wert des den Kanal exprimierenden Kompartiments und/oder die Spannung über die den Kanal umschliessende Membran. Eine Veränderung eines oder beider physikalischer Parameter bedeutet, daß die Testsubstanz den betreffenden Chloridkanal beeinflußt. Eine Erhöhung des pH-Wertes bedeutet, daß es sich um eine den Chloridkanal (partiell) hemmende bzw. (partiell) inhibierende Substanz handelt. Die Erniedrigung des pH-Wertes deutet auf eine Ansäuerung des Kompartiments und damit auf eine den Chloridkanal aktivierende Substanz hin. Ebenso bedeutet die Messung einer Spannungserhöhung, daß es sich um eine den Chloridkanal (partiell) hemmende bzw. (partiell) inhibierende Substanz handelt. Die Erniedrigung der Spannung deutet auf eine den Chloridkanal aktivierende Substanz hin. Dabei ist die Aktivität einer Substanz im Hinblick auf ihre Fähigkeit, den betreffenden Chloridkanal zu beeinflussen, umso höher, je niedriger die hinzuzusetzende Konzentration der Substanz ist, um eine Änderung des oder der physikalischen Parameter zu bewirken.

Das erfindungsgemäße Verfahren beruht auf dem Prinzip, daß eine Änderung der Aktivität intrazellulärer Chloridkanäle den luminalen pH-Wert der sie exprimierenden Kompartimente und/oder die Spannung über die sie umschließende Membran ändern kann. Chloridkanäle gestatten einen Ladungsausgleich für die in den gleichen Vesikeln (z.B. des endo- oder exozytotischen Weges) vorkommende Protonenpumpe, die eine höhere Pumpleistung und damit eine stärkere Ansäuerung des Kompartiments bewirken. Gleichzeitig

verringern sie die elektrische Spannung über diese Membran. Eine Inhibition oder Ausschaltung der Chloridkanäle würde also eine verringerte Ansäuerung und eine größere elektrische Spannung, eine Stimulation Ihrer Aktivität jedoch eine verstärkte Ansäuerung und eine Verringerung der elektrischen Spannung zur Folge haben. Bei der vorliegenden Erfindung wird der Effekt der zu testenden Substanzen auf die entsprechenden Chloridkanäle indirekt über einen oder mehrere Effekte der veränderten Ansäuerung und/oder Spannung von intrazellulären Kompartimenten gemessen. Um spezifische Substanzen für einen bestimmten Kanaltyp zu identifizieren, sollen die gemessenen Kompartimente in der bevorzugten Anwendung möglichst nur einen Chloridkanal, gegen den getestet wird, enthalten. Die Chloridkanal-Spezifität wird dadurch belegt, daß man Kontroll-Untersuchungen an Zelllinien durchführt, die einen anderen Kanal exprimieren. Sofern die Kompartimente mehr als einen Chloridkanal exprimieren, müssen weitere Messungen an anderen KO-Zelllinien oder -Mäusen durchgeführt werden, wie oben beschrieben.

Das erfindungsgemäße Verfahren zum Identifizieren und Testen von Substanzen, die geeignet sind, einen oder mehrere Chloridkanäle aus der Gruppe bestehend aus ClC-3, ClC-4, ClC-5, ClC-6 und/oder ClC-7 zu inhibieren, ist dadurch gekennzeichnet, daß man

- a) an Zellen, die nur einen oder hauptsächlich bzw. überwiegend nur einen der genannten Chloridkanäle exprimieren, den luminalen pH-Wert der den Kanal exprimierenden Kompartimente und/oder die Spannung über die den Kanal umschliessende Membran mißt,
- b) die Zellen mit einer Substanz in Kontakt bringt und
- c) an den Zellen erneut den luminalen pH-Wert der den Kanal exprimierenden Kompartimente und/oder die Spannung über die den Kanal umschliessende Membran mißt,

wobei der Unterschied zwischen dem pH-Wert und/oder der Membranspannung vor und nach Zugabe der Substanz die Aktivität der Substanz bestimmt.

Wie bereits erwähnt, besteht eine Verfahrensvariante in der direkten Messung des pH-Wertes intrazellulärer Organellen oder in der Messung der infolge der Änderung des pH-Werts eintretenden zellulären Effekte. Zur Messung des pH-Wertes kommen mehrere Methoden in Frage. Es gibt beispielsweise Farbstoffe, deren Fluoreszenz pH-abhängig ist und/oder die sich in Kompartimenten mit bestimmten pH-Werten selektiv anreichern, wenn man die Zellen mit ihnen oder ihren Vorläuferstufen inkubiert (Beispiele: Acridin Orange, LysoTracker und andere Farbstoffe der Fa. Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA). Höhere Spezifität für bestimmte Kompartimente lässt sich z.B. durch endozytotische Aufnahme von Farbstoffen erreichen (Anfärben endozytotischer Kompartimente, je nach Aufnahmezeit frühe oder späte bis lysosomale Kompartimente; vgl. z.B. Publikationen (71), (75), (76)). Noch höhere Spezifität für bestimmte Kompartimente lässt sich dadurch erreichen, daß die Farbstoffe über angekoppelte Molekülgruppen (wie z.B. spezifische Antikörper oder Biotin) an bestimmte Zielmoleküle gebunden werden, die in bestimmten Kompartimenten vermehrt oder ausschliesslich vorkommen, d.h., die in der Zelllinie exprimiert werden (z.B. durch permanente Transfektion), wobei man die Zelllinie mit dem Farbstoff in Kontakt bringt. Diese Zielmoleküle können auch über molekular-zellbiologische Techniken hergestellt werden, indem z.B. ein Zielsteuerungssignal, das das Molekül über die entsprechende Maschinerie der Zelle in ein bestimmtes Kompartiment dirigiert, an ein entsprechendes Bindungsmotif (z.B. Epitop für Antikörper oder Avidin) molekularbiologisch fusioniert wird und das Konstrukt dann in der entsprechenden Zelllinie, die zum Testen der Substanzen dient, exprimiert wird. Durch derartige Techniken lassen sich vorwiegend bis sehr spezifisch nur bestimmte Kompartimente (in denen der entsprechende Kanal vorkommt) messen. Als weitere Technik zur pH-Messung dienen auch z.B. die Akkumulation bestimmter Substanzen in Kompartimenten mit einem bestimmten

pH-Wert (wie z.B. Acridin Orange oder Lysotractor von Molecular Probes) oder indirekte Tests, bei denen pH-abhängige Reaktionen in den Kompartments ausgenutzt werden, um Indikatorsubstanzen herzustellen (z.B. durch pH-abhängige proteolytische Spaltung), die dann leicht nachweisbar sind (z.B. durch Verwendung von Farbstoffen (vgl. Publikationen (95) und (96)), wobei der Nachweis aber nicht darauf beschränkt ist).

Alternativ oder zusätzlich kann die Membranspannung in diesen Kompartimenten gemessen werden, z.B. über Spannungs-sensitive Farbstoffe (vgl. z.B. Publikation (67)). Alternativ kommen auch hier protein-kodierte Spannungssensoren (vgl. z.B. Publikation (77)), die möglicherweise noch spezifisch gelenkt bzw. sortiert werden, in Frage.

Mit der vorliegenden Erfindung wird erstmals ein Testsystem zur Verfügung gestellt, mit dem sich Wirkstoffe identifizieren und testen lassen, die zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung von Osteoporose oder Morbus Paget oder zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung neurologischer und neuromuskulärer Erkrankungen sowie anderer Nervenkrankheiten oder zur Herstellung von Psychopharmaka geeignet sind. Erfindungsgegenstand ist somit auch die Verwendung von Substanzen, die den Chloridkanal ClC-7 ganz oder teilweise inhibieren, zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung von Osteoporose oder Morbus Paget, sowie die Verwendung von Substanzen, die den Chloridkanal ClC-3, ClC-4, ClC-6 und/oder ClC-7 ganz oder teilweise inhibieren, zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung neurologischer und neuromuskulärer Erkrankungen sowie anderer Nervenkrankheiten oder von Psychopharmaka. Ferner betrifft die Erfindung pharmazeutische Zusammensetzungen (Arzneimittel) zur Behandlung von Osteoporose oder Morbus Paget, die ein oder mehrere Substanzen enthalten, die den Chloridkanal ClC-7 ganz oder teilweise inhibieren, sowie Arzneimittel zur Behandlung neurologischer und neuromuskulärer Erkrankungen sowie anderer Nervenkrankheiten und Psychopharmaka, die ein oder mehrere Substanzen enthalten, die den Chloridkanal ClC-3, ClC-4,

ClC-6 und/oder ClC-7 ganz oder teilweise inhibieren. Die Arzneimittel enthalten die Wirkstoffe in zur oralen oder intravenösen Verabreichung geeigneter Formulierung, gegebenenfalls zusammen mit pharmazeutisch verträglichen Trägerstoffen.

Die Erfindung wird nachfolgend anhand von Beispielen näher erläutert.

Beschreibung der Figuren:

Fig. 1: Transmembran Topologie-Modell von ClC-Kanälen nach der biochemischen Studie von Schmidt-Rose und Jentsch (T. Schmidt-Rose und T.J. Jentsch, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94 (1997) 7633-7638). N- und C-Termini sind intrazellulär lokalisiert. Initiale Hydropathie-Analyse von ClC-0 zeigte das Vorliegen von bis zu 13 Transmembrandomänen (D1-D13). Außer einigen prokaryontischen ClCs besitzen alle bekannten ClC-Proteine zwei CBS-Domänen (vgl. A. Bateman, Trends Biochem. Sci. 22 (1997) 12-13 und C.P. Pointing, Mol. Med. 75 (1997) 160-163) am C-Terminus.

Beispiele

Beispiel 1

Protokoll zur Erzeugung von Knock-outs am Beispiel des ClC-7:

Die ClC-7 knock-out Maus wurde über Standard-Methoden hergestellt, die dem Fachmann gut bekannt sind und u.a. in Methodenbüchern (vgl. z.B. Publikation (78)) detailliert beschrieben sind. Diese Technik erfordert mehrere Schritte. Im ersten Schritt wird ein DNA Konstrukt hergestellt, das neben der Zielsequenz (in diesem Fall genomische Sequenz der Maus, die das für den ClC-7 Kanal kodierende Gen enthält) entsprechende Selektionsmarker enthält. Im zweiten Schritt wird mit Hilfe dieses DNA Konstrukts ein Allel des Zielgens in pluripotenten embryonalen Stammzellen der Maus über homologe Rekombination so verändert, daß es nicht mehr für ein funktionelles Protein kodieren kann. Im dritten Schritt werden diese rekombinanten embryonalen Stammzellen in Maus-Blastozysten injiziert, die danach pseudo-schwangeren Ammenmüttern (Mäuse) in den Uterus transplantiert werden. Diese tragen dann Nachkommen aus, die chimär sind, d.h. neben den genetisch modifizierten Zellen, die aus den injizierten Stammzellen hervorgehen, auch normale, genetisch nicht manipulierte Zellen der Blastozyste, in die injiziert wurde, enthalten. Diese chimären Mäuse werden mit normalen "Wildtyp" (WT) Mäusen verpaart. Bei den Nachkommen wird getestet (z.B. über Southern blotting oder über PCR Techniken) ob das genetisch modifizierte, also funktionell zerstörte, Gen über die Keimbahn vererbt wurde. Im positiven Fall handelt es sich jetzt um heterozygote Tiere, bei denen das Kanalgen auf einem der beiden Chromosomen zerstört ist. Heterozygote Mäuse werden untereinander gekreuzt, um letztendlich homozygote knock-out Tiere zu erhalten, bei denen die entsprechenden Kanalgene auf beiden Chromosomen zerstört sind.

Im Fall der ClC-7 KO Maus wurde das Konstrukt wie folgt hergestellt: Mit Hilfe einer Ratten cDNA-Sonde (Proteinsequenz publi-

ziert in Referenz (79)); Accession No. für Protein und cDNA: Z67744 GenBank) wurde eine kommerziell erhältliche genomische Phagenbank in dem Vektor λ FIXII des Mausstammes 129/Sv (Firma Stratagene, 11011 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037, USA) über Standardmethoden der Ausplattierung, Abziehen von Filtern, und Hybridisierung mit der radioaktiv markierten cDNA Sonde durchmustert. Mehrere Phagenklone, die unter hoher Stringenz hybridisierten, wurden isoliert, gereinigt, und mit Standardmethoden der Restriktionskartierung, Ansequenzierung, und Probeamplifikation ausgewählter Fragmente über PCR, analysiert. Ein genomischer Klon, der ein ungefähr 14 kb grosses Stück der genomischen Sequenz von ClC-7 inklusive des Exons 2 (vgl. (80)) enthielt, wurde zur Herstellung des Konstrukts ausgewählt. Hierbei wurde der genomische Klon mit den beiden Restriktionsenzymen BglII und BsrGI verdaut, wodurch der Teil der Sequenz, der die kodierenden Exone 3, 4, 5, 6 und 7 enthält, entfernt wurde. Dieser Teil wurde durch ein ungefähr 1.6 kb grosses DNA Fragment, das eine von dem Phosphoglycerat-Promotor getriebene Neomycinresistenz Kasette enthält, ersetzt, indem letzteres durch entsprechende enzymatische Reaktionen nach Standardverfahren in die genomische Sequenz ligiert wurde. Nach Transformation von Bakterien mit dem entsprechenden, dieses Konstrukt enthaltenen Vektors wurden die das korrekte Konstrukt enthaltenen Bakterienkolonien isoliert, die DNA extrahiert, und nach Verdau mit HindIII am 5'-Ende des Konstruktes eine Thymidin-Kinase Kasette zur negativen Selektion angefügt. Nach abermaliger Transformation, Isolation und Überprüfung des nunmehr fertigen Konstruktes wurden damit pluripotente embryonale Stammzellen (Maus) durch Elektroporation transfiziert und unter entsprechenden Kulturbedingungen (Kultivation auf "feeder layers" in Anwesenheit von leukaemia inhibitory factor (LIF), um eine Differenzierung zu verhindern) ausplattiert und vermehrt. Die Zellen wurden mit G418 (Selektion auf die Anwesenheit der Neomycinresistenzkasette) und Gancyclovir (Selektion auf Abwesenheit der Thymidinkinase Kasette) selektioniert. Resistente Klone wurden isoliert, breitgezogen, und über Southern Blot Analyse auf homologe Rekombination am ClC-7 Locus analysiert.

Richtige Klone, bei denen das ClC-7 Gen auf einem Chromosom zerstört war (d.h. die Exone 3-7 durch die Neomycinkassette ersetzt waren), wurden hochgezogen und unter mikroskopischer Kontrolle mit Mikromanipulatoren wie oben beschrieben in Mausblastozysten injiziert. Das weitere Vorgehen war wie oben beschrieben. Da die genetische Veränderung über die Keimbahn vererbt wurde, gelang so die Herstellung einer ClC-7 KO-Maus. Die Abwesenheit des ClC-7 Kanalproteins wurde mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers nachgewiesen, der gegen ein aminoterminales Peptid von ClC-7 hergestellt wurde. Die ClC-7 KO Maus zeigte unerwarteterweise den Phänotyp einer starken Osteopetrose, einhergehend mit einer Retina-Degeneration und Anzeichen degenerativer Veränderungen im Zentralnervensystem.

Beispiel 2

Erzeugung einer ClC-3 KO-Maus:

Auf ähnliche Weise wie in Beispiel 1 beschrieben wurde auch eine ClC-3 KO Maus hergestellt, bei der Exon 3, das für Sequenzen in der ersten Transmembrandomäne kodiert (vgl. Publikationen (83) und (84)), deletiert wurde. Dieses Konstrukt führt ausserdem zu einem frühzeitigen Stop der Translation, so daß ein sehr kleines, trunkiertes Protein vorhergesagt wurde. In der KO Maus konnte mit einem spezifischen Antikörper, der gegen ein aminoterminales Peptid von ClC-3 hergestellt wurde, kein ClC-3 Protein mehr nachgewiesen werden. Die ClC-3 KO Maus zeigte eine Degeneration des Hippocampus und eine Retinadegeneration. Es konnte nachgewiesen werden, dass der ClC-3 Chloridkanal in intrazellulären, vorwiegend endosomalen Kompartimenten und synaptischen Vesikeln vorkommt. pH-Messungen ergaben, daß das Fehlen von ClC-3 eine Verringerung der Azifidierung synaptischer Vesikel verursachte.

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Dr. Jentsch Prof., Thomas J.

<120> Testsystem zur Entwicklung von Therapeutika,
insbesondere von Wirkstoffen zur Behandlung von
Osteoporose

<130> P056405

<140>

<141>

<160> 14

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> .1

<211> 3953

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> gene

<222> (1)..(3953)

<223> CLCN3

<220>

<221> CDS

<222> (489)..(2951)

<223> ClC-3

<300>

<303> Genomics

<304> 1995

<305> 27 (1)

<306> 131-141

<308> GenBank/ NM_001829 GI:4502868

<300>

<303> Hum. Genet.

<304> 1998

<305> 102 (2)

<306> 178-181

<400> 1

```
gggggtcacgg gcgaactaga acactgggaa aggggctgca gggtccggac cggaccggcc 60
ctgacccgga ataatgagca aggaggggtgt ggtgggttga aagccatcct actttactcc 120
cgagtttagag catggattca gtttttagtct taagggggaa gtgagattgg agatttttat 180
ttttaatttt gggcagaagc aggttgactc tagggatctc cagagcgaga ggatttaact 240
tcatgttgct cccgtgtttg aaggaggaca ataaaagtcc caccgggcaa aattttcgta 300
acctctgcgg tagaaaacgt caggatatctt ttaaatcgcg atagttttcg ctgtgtcagg 360
ctttcttcgg tggagctccg agggtagcta ggttctaggt ttgaaacaga tgcagaatcc 420
aaaggcagcg caaaaaacag ccaccgattt tgctatgtct ctgagctgcg agataatcag 480
acagctaa atg gag tct gag cag ctg ttc cat aga ggc tac tat aga aac 530
Met Glu Ser Glu Gln Leu Phe His Arg Gly Tyr Tyr Arg Asn
      1              5              10
```


agc	tac	aac	agt	ata	aca	agt	gca	agt	agt	gat	gag	gaa	ctt	tta	gat	578
Ser	Tyr	Asn	Ser	Ile	Thr	Ser	Ala	Ser	Ser	Asp	Glu	Glu	Leu	Leu	Asp	
15					20					25					30	
gga	gca	ggt	ggt	att	atg	gac	ttt	caa	aca	tct	gaa	gat	gac	aat	tta	626
Gly	Ala	Gly	Val	Ile	Met	Asp	Phe	Gln	Thr	Ser	Glu	Asp	Asp	Asn	Leu	
				35					40					45		
tta	gat	ggt	gac	act	gca	ggt	gga	act	cat	tat	aca	atg	aca	aat	gga	674
Leu	Asp	Gly	Asp	Thr	Ala	Val	Gly	Thr	His	Tyr	Thr	Met	Thr	Asn	Gly	
			50					55					60			
ggc	agc	att	aac	agt	tct	aca	cat	tta	ctg	gat	ctt	ttg	gat	gaa	cca	722
Gly	Ser	Ile	Asn	Ser	Ser	Thr	His	Leu	Leu	Asp	Leu	Leu	Asp	Glu	Pro	
		65					70					75				
att	cca	ggt	ggt	ggt	aca	tat	gat	gat	ttc	cat	act	att	gat	tgg	gtg	770
Ile	Pro	Gly	Val	Gly	Thr	Tyr	Asp	Asp	Phe	His	Thr	Ile	Asp	Trp	Val	
	80					85					90					
cga	gaa	aaa	tgt	aaa	gac	aga	gaa	agg	cat	aga	cgg	atc	aac	agc	aaa	818
Arg	Glu	Lys	Cys	Lys	Asp	Arg	Glu	Arg	His	Arg	Arg	Ile	Asn	Ser	Lys	
95					100					105					110	
aag	aaa	gaa	tca	gca	tgg	gaa	atg	aca	aaa	agt	ttg	tat	gat	gcg	tgg	866
Lys	Lys	Glu	Ser	Ala	Trp	Glu	Met	Thr	Lys	Ser	Leu	Tyr	Asp	Ala	Trp	
				115					120					125		
tca	gga	tgg	cta	gta	gta	aca	cta	aca	gga	ttg	gca	tca	ggg	gca	ctg	914
Ser	Gly	Trp	Leu	Val	Val	Thr	Leu	Thr	Gly	Leu	Ala	Ser	Gly	Ala	Leu	
			130					135					140			
gcc	gga	tta	ata	gac	att	gct	gcc	gat	tgg	atg	act	gac	cta	aag	gag	962
Ala	Gly	Leu	Ile	Asp	Ile	Ala	Ala	Asp	Trp	Met	Thr	Asp	Leu	Lys	Glu	
		145					150					155				
ggc	att	tgc	ctt	agt	gcg	ttg	tgg	tac	aac	cac	gaa	cag	tgc	tgt	tgg	1010
Gly	Ile	Cys	Leu	Ser	Ala	Leu	Trp	Tyr	Asn	His	Glu	Gln	Cys	Cys	Trp	
	160					165					170					
gga	tct	aat	gaa	aca	aca	ttt	gaa	gag	agg	gat	aaa	tgt	cca	cag	tgg	1058
Gly	Ser	Asn	Glu	Thr	Thr	Phe	Glu	Glu	Arg	Asp	Lys	Cys	Pro	Gln	Trp	
175					180					185					190	
aaa	aca	tgg	gca	gaa	tta	atc	ata	ggt	caa	gca	gag	ggt	cct	ggt	tct	1106
Lys	Thr	Trp	Ala	Glu	Leu	Ile	Ile	Gly	Gln	Ala	Glu	Gly	Pro	Gly	Ser	
				195					200					205		
tat	atc	atg	aac	tac	ata	atg	tac	atc	ttc	tgg	gcc	ttg	agt	ttt	gcc	1154
Tyr	Ile	Met	Asn	Tyr	Ile	Met	Tyr	Ile	Phe	Trp	Ala	Leu	Ser	Phe	Ala	
			210					215					220			
ttt	ctt	gca	ggt	tcc	ctg	gta	aag	gta	ttt	gct	cca	tat	gcc	tgt	ggc	1202
Phe	Leu	Ala	Val	Ser	Leu	Val	Lys	Val	Phe	Ala	Pro	Tyr	Ala	Cys	Gly	
		225					230					235				
tct	gga	att	cca	gag	att	aaa	act	att	tta	agt	gga	ttc	atc	atc	aga	1250
Ser	Gly	Ile	Pro	Glu	Ile	Lys	Thr	Ile	Leu	Ser	Gly	Phe	Ile	Ile	Arg	
	240					245					250					
ggt	tac	ttg	gga	aaa	tgg	act	tta	atg	att	aaa	acc	atc	aca	tta	gtc	1298
Gly	Tyr	Leu	Gly	Lys	Trp	Thr	Leu	Met	Ile	Lys	Thr	Ile	Thr	Leu	Val	
255					260					265					270	
ctg	gct	gtg	gca	tca	ggt	ttg	agt	tta	gga	aaa	gaa	ggt	ccc	ctg	gta	1346
Leu	Ala	Val	Ala	Ser	Gly	Leu	Ser	Leu	Gly	Lys	Glu	Gly	Pro	Leu	Val	
				275					280					285		
cat	ggt	gcc	tgt	tgc	tgc	gga	aat	atc	ttt	tcc	tac	ctc	ttt	cca	aag	1394

His	Val	Ala	Cys 290	Cys	Cys	Gly	Asn 295	Ile	Phe	Ser	Tyr	Leu	Phe 300	Pro	Lys	
tat	agc	aca	aac	gaa	gct	aaa	aaa	agg	gag	gtg	cta	tca	gct	gcc	tca	1442
Tyr	Ser	Thr	Asn 305	Glu	Ala	Lys	Lys 310	Arg	Glu	Val	Leu	Ser 315	Ala	Ala	Ser	
gct	gca	ggg	gtt	tct	gta	gct	ttt	ggg	gca	cca	att	gga	gga	gtt	ctt	1490
Ala	Ala	Gly	Val	Ser	Val	Ala	Phe 325	Gly	Ala	Pro	Ile 330	Gly	Gly	Val	Leu	
ttt	agc	ctg	gaa	gag	gtt	agc	tat	tat	ttt	cct	ctc	aaa	act	tta	tgg	1538
Phe	Ser	Leu	Glu	Glu	Val	Ser	Tyr 340	Tyr	Phe	Pro	Leu 345	Lys	Thr	Leu	Trp 350	
aga	tca	ttt	ttt	gct	gct	tta	gtg	gct	gca	ttt	gtt	ttg	agg	tcc	atc	1586
Arg	Ser	Phe	Phe 355	Ala	Ala	Leu	Val	Ala	Ala 360	Phe	Val	Leu	Arg	Ser 365	Ile	
aat	cca	ttt	ggg	aac	agc	cgt	ctg	gtc	ctt	ttt	tat	gtg	gag	tat	cat	1634
Asn	Pro	Phe	Gly 370	Asn	Ser	Arg	Leu	Val	Leu 375	Phe	Tyr	Val	Glu	Tyr	His	
aca	cca	tgg	tac	ctt	ttt	gaa	ctg	ttt	cct	ttt	att	ctt	cta	ggg	gta	1682
Thr	Pro	Trp 385	Tyr	Leu	Phe	Glu	Leu 390	Phe	Pro	Phe	Ile	Leu 395	Leu	Gly	Val	
ttt	gga	ggg	ctt	tgg	gga	gcc	ttt	ttc	att	agg	gca	aat	att	gcc	tgg	1730
Phe	Gly	Gly	Leu	Trp	Gly	Ala	Phe 405	Phe	Ile	Arg	Ala 410	Asn	Ile	Ala	Trp	
tgt	cgt	cga	cgc	aag	tcc	acg	aaa	ttt	gga	aag	tat	ccc	gtt	ctg	gaa	1778
Cys	Arg	Arg	Arg	Lys	Ser	Thr	Lys 420	Phe	Gly	Lys	Tyr 425	Pro	Val	Leu	Glu 430	
gtc	att	att	gtt	gca	gcc	att	act	gct	gtg	ata	gcc	ttc	cct	aat	cca	1826
Val	Ile	Ile	Val 435	Ala	Ala	Ile	Thr	Ala	Val 440	Ile	Ala	Phe	Pro	Asn 445	Pro	
tac	act	agg	cta	aac	acc	agt	gaa	ctg	atc	aaa	gag	ctt	ttt	aca	gac	1874
Tyr	Thr	Arg	Leu 450	Asn	Thr	Ser	Glu	Leu	Ile 455	Lys	Glu	Leu	Phe	Thr 460	Asp	
tgt	ggg	ccc	ctg	gaa	tcc	tct	tct	ctt	tgt	gac	tac	aga	aat	gac	atg	1922
Cys	Gly	Pro 465	Leu	Glu	Ser	Ser	Ser 470	Leu	Cys	Asp	Tyr	Arg 475	Asn	Asp	Met	
aat	gcc	agt	aaa	att	gtc	gat	gac	att	cct	gat	cgt	cca	gca	ggc	att	1970
Asn	Ala	Ser	Lys	Ile	Val	Asp	Asp 485	Ile	Pro	Asp	Arg 490	Pro	Ala	Gly	Ile	
gga	gta	tat	tca	gct	ata	tgg	cag	tta	tgc	ctg	gca	ctc	ata	ttt	aaa	2018
Gly	Val	Tyr	Ser	Ala	Ile	Trp	Gln	Leu	Cys	Leu	Ala	Leu	Ile	Phe	Lys 510	
atc	ata	atg	aca	gta	ttc	act	ttt	ggc	atc	aag	gtt	cca	tca	ggc	ttg	2066
Ile	Ile	Met	Thr 515	Val	Phe	Thr	Phe	Gly	Ile 520	Lys	Val	Pro	Ser	Gly 525	Leu	
ttc	atc	ccc	agc	atg	gcc	att	gga	gcg	atc	gca	gga	agg	att	gtg	ggg	2114
Phe	Ile	Pro	Ser 530	Met	Ala	Ile	Gly	Ala	Ile 535	Ala	Gly	Arg	Ile	Val	Gly	
att	gcg	gtg	gag	cag	ctt	gcc	tac	tat	cac	cac	gac	tgg	ttt	atc	ttt	2162
Ile	Ala	Val	Glu 545	Gln	Leu	Ala	Tyr 550	Tyr	His	His	Asp	Trp 555	Phe	Ile	Phe	
aag	gag	tgg	tgt	gag	gtc	ggg	gct	gat	tgc	att	aca	cct	ggc	ctt	tat	2210

[illegible]

ttttctcct ttacaaaaaa agaaaggaaa tataaaagcc gggtttttgc aacatggttt 3101
 gcaaataatg ctgggtggaat ggaggagttg tttggggagg gaaaggagag agaaggaaaag 3161
 gaggtaggta tttcccgctt aacagaaaagc agcgtatcaa ctctatttgt tctgcactgg 3221
 atgcattcag ctgaggatgt gcctgatagt gcaggcttgc gcctcaacag agatgacagc 3281
 agagtcctcg agcacctggc ctgtttgctc acatgcaaga cacatacagc cctattctag 3341
 aggatacttg aatggacctc tataaacgca aggttcttgc ctttttttaa tcaaaactgt 3401
 tctgtttaat tcatgaattg tatagttaag cattaccttt ctacattcca gaagagcctt 3461
 tatttctctc tctctctctc tctctctctc tctctctact gagctgtaac aaagcctctt 3521
 taaatcggtg tacccttttg aagcagtcct ttctcatatt gagatgtact gtgattttac 3581
 tgaggtttca tcacaagaag ggagtgtttc ttgtgccatt aaccatgtag tttgtaccat 3641
 cactaaatgc ttggaacagt acacatgcac cacaacaaag gctcatcaaa caggtaaagt 3701
 ctggaaggaa gcgagaacga aatctctcat tgtgtgccgt gtggctcaaa accgaaaaca 3761
 atgaagcttg gttttaaaagg ataaagtttt cttttttggt ttcctctcag actttatgga 3821
 taatgtgacc gggctcttatg caaattttct atttctaaaa ctactactat gatatacaag 3881
 tgctgttgag cataattaaa taaaatgctg ctgctttgac agtaaagaga aggaagtatt 3941
 ctgaaaaaaa ac 3953

<210> 2
 <211> 820
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2
 Met Glu Ser Glu Gln Leu Phe His Arg Gly Tyr Tyr Arg Asn Ser Tyr
 1 5 10 15
 Asn Ser Ile Thr Ser Ala Ser Ser Asp Glu Glu Leu Leu Asp Gly Ala
 20 25 30
 Gly Val Ile Met Asp Phe Gln Thr Ser Glu Asp Asp Asn Leu Leu Asp
 35 40 45
 Gly Asp Thr Ala Val Gly Thr His Tyr Thr Met Thr Asn Gly Gly Ser
 50 55 60
 Ile Asn Ser Ser Thr His Leu Leu Asp Leu Leu Asp Glu Pro Ile Pro
 65 70 75 80
 Gly Val Gly Thr Tyr Asp Asp Phe His Thr Ile Asp Trp Val Arg Glu
 85 90 95
 Lys Cys Lys Asp Arg Glu Arg His Arg Arg Ile Asn Ser Lys Lys Lys
 100 105 110
 Glu Ser Ala Trp Glu Met Thr Lys Ser Leu Tyr Asp Ala Trp Ser Gly
 115 120 125
 Trp Leu Val Val Thr Leu Thr Gly Leu Ala Ser Gly Ala Leu Ala Gly
 130 135 140
 Leu Ile Asp Ile Ala Ala Asp Trp Met Thr Asp Leu Lys Glu Gly Ile
 145 150 155 160
 Cys Leu Ser Ala Leu Trp Tyr Asn His Glu Gln Cys Cys Trp Gly Ser
 165 170 175
 Asn Glu Thr Thr Phe Glu Glu Arg Asp Lys Cys Pro Gln Trp Lys Thr
 180 185 190
 Trp Ala Glu Leu Ile Ile Gly Gln Ala Glu Gly Pro Gly Ser Tyr Ile
 195 200 205
 Met Asn Tyr Ile Met Tyr Ile Phe Trp Ala Leu Ser Phe Ala Phe Leu
 210 215 220
 Ala Val Ser Leu Val Lys Val Phe Ala Pro Tyr Ala Cys Gly Ser Gly
 225 230 235 240

Ile	Pro	Glu	Ile	Lys	Thr	Ile	Leu	Ser	Gly	Phe	Ile	Ile	Arg	Gly	Tyr	245	250	255
Leu	Gly	Lys	Trp	Thr	Leu	Met	Ile	Lys	Thr	Ile	Thr	Leu	Val	Leu	Ala	260	265	270
Val	Ala	Ser	Gly	Leu	Ser	Leu	Gly	Lys	Glu	Gly	Pro	Leu	Val	His	Val	275	280	285
Ala	Cys	Cys	Cys	Gly	Asn	Ile	Phe	Ser	Tyr	Leu	Phe	Pro	Lys	Tyr	Ser	290	295	300
Thr	Asn	Glu	Ala	Lys	Lys	Arg	Glu	Val	Leu	Ser	Ala	Ala	Ser	Ala	Ala	305	310	315
Gly	Val	Ser	Val	Ala	Phe	Gly	Ala	Pro	Ile	Gly	Gly	Val	Leu	Phe	Ser	325	330	335
Leu	Glu	Glu	Val	Ser	Tyr	Tyr	Phe	Pro	Leu	Lys	Thr	Leu	Trp	Arg	Ser	340	345	350
Phe	Phe	Ala	Ala	Leu	Val	Ala	Ala	Phe	Val	Leu	Arg	Ser	Ile	Asn	Pro	355	360	365
Phe	Gly	Asn	Ser	Arg	Leu	Val	Leu	Phe	Tyr	Val	Glu	Tyr	His	Thr	Pro	370	375	380
Trp	Tyr	Leu	Phe	Glu	Leu	Phe	Pro	Phe	Ile	Leu	Leu	Gly	Val	Phe	Gly	385	390	395
Gly	Leu	Trp	Gly	Ala	Phe	Phe	Ile	Arg	Ala	Asn	Ile	Ala	Trp	Cys	Arg	405	410	415
Arg	Arg	Lys	Ser	Thr	Lys	Phe	Gly	Lys	Tyr	Pro	Val	Leu	Glu	Val	Ile	420	425	430
Ile	Val	Ala	Ala	Ile	Thr	Ala	Val	Ile	Ala	Phe	Pro	Asn	Pro	Tyr	Thr	435	440	445
Arg	Leu	Asn	Thr	Ser	Glu	Leu	Ile	Lys	Glu	Leu	Phe	Thr	Asp	Cys	Gly	450	455	460
Pro	Leu	Glu	Ser	Ser	Ser	Leu	Cys	Asp	Tyr	Arg	Asn	Asp	Met	Asn	Ala	465	470	475
Ser	Lys	Ile	Val	Asp	Asp	Ile	Pro	Asp	Arg	Pro	Ala	Gly	Ile	Gly	Val	485	490	495
Tyr	Ser	Ala	Ile	Trp	Gln	Leu	Cys	Leu	Ala	Leu	Ile	Phe	Lys	Ile	Ile	500	505	510
Met	Thr	Val	Phe	Thr	Phe	Gly	Ile	Lys	Val	Pro	Ser	Gly	Leu	Phe	Ile	515	520	525
Pro	Ser	Met	Ala	Ile	Gly	Ala	Ile	Ala	Gly	Arg	Ile	Val	Gly	Ile	Ala	530	535	540
Val	Glu	Gln	Leu	Ala	Tyr	His	His	Asp	Trp	Phe	Ile	Phe	Lys	Glu		545	550	555
Trp	Cys	Glu	Val	Gly	Ala	Asp	Cys	Ile	Thr	Pro	Gly	Leu	Tyr	Ala	Met	565	570	575
Val	Gly	Ala	Ala	Ala	Cys	Leu	Gly	Gly	Val	Thr	Arg	Met	Thr	Val	Ser	580	585	590
Leu	Val	Val	Ile	Val	Phe	Glu	Leu	Thr	Gly	Gly	Leu	Glu	Tyr	Ile	Val	595	600	605
Pro	Leu	Met	Ala	Ala	Val	Met	Thr	Ser	Lys	Trp	Val	Gly	Asp	Ala	Phe	610	615	620
Gly	Arg	Glu	Gly	Ile	Tyr	Glu	Ala	His	Ile	Arg	Leu	Asn	Gly	Tyr	Pro	625	630	635
Phe	Leu	Asp	Ala	Lys	Glu	Glu	Phe	Glu	Phe	Thr	His	Thr	Thr	Leu	Ala	645	650	655
Ala	Asp	Val	Met	Arg	Pro	Arg	Arg	Asn	Asp	Pro	Pro	Leu	Ala	Val	Leu	660	665	670
Thr	Gln	Asp	Asn	Met	Thr	Val	Asp	Asp	Ile	Glu	Asn	Met	Ile	Asn	Glu	675	680	685
Thr	Ser	Tyr	Asn	Gly	Phe	Pro	Val	Ile	Met	Ser	Lys	Glu	Ser	Gln	Arg	690	695	700
Leu	Val	Gly	Phe	Ala	Leu	Arg	Arg	Asp	Leu	Thr	Ile	Ala	Ile	Glu	Ser	705	710	715
Ala	Arg	Lys	Lys	Gln	Glu	Gly	Ile	Val	Gly	Ser	Ser	Arg	Val	Cys	Phe	725	730	735
Ala	Gln	His	Thr	Pro	Ser	Leu	Pro	Ala	Glu	Ser	Pro	Arg	Pro	Leu	Lys	740	745	750
Leu	Arg	Ser	Ile	Leu	Asp	Met	Ser	Pro	Phe	Thr	Val	Thr	Asp	His	Thr	755	760	765
Pro	Met	Glu	Ile	Val	Val	Asp	Ile	Phe	Arg	Lys	Leu	Gly	Leu	Arg	Gln	770	775	780

Cys	Leu	Val	Thr	His	Asn	Gly	Arg	Leu	Leu	Gly	Ile	Ile	Thr	Lys	Lys
785					790					795					800
Asp	Ile	Leu	Arg	His	Met	Ala	Gln	Thr	Ala	Asn	Gln	Asp	Pro	Ala	Ser
				805					810					815	
Ile	Met	Phe	Asn												
			820												

<210> 3
 <211> 2758
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> gene
 <222> (1)..(2758)
 <223> Clcn3

<220>
 <221> CDS
 <222> (376)..(2658)

<300>
 <303> Genomics
 <304> 1995
 <305> 27 (1)
 <306> 131-141

<300>
 <308> Genbank/NM_007711 GI:6680947

<400> 3
 gctggagtgg gcggaggcgt gagaaccgcg ttactttcct cccgaggtgg agagagactg 60
 ctccctgtagt ccttggagag cgcagtgagc ctccagtcgg ggcagaggcg gggttggtttg 120
 agggccccgt ggagccgagg attgaacaac accctgaaac cagcctccgc cgggtccgacc 180
 tggccgcctt tacgtaacct ctccctgaaag ccggtagcag taaagtccgc cgggggtggcc 240
 acccggcagc ggtgtcccg ggaagctccc ggggaggcgt gcgcgcgac gcaagcagat 300
 gcgggggtcca caggcagcgc agccaccagc cgcccagctt gctatgcctc tgagctgcaa 360
 ggaactcatt ataca atg aca aat gga ggc agc att aat agc tct aca cac 411
 Met Thr Asn Gly Gly Ser Ile Asn Ser Ser Thr His
 1 5 10
 ttg ctg gat ctt tta gat gag cct atc cca ggt gtc ggt acc tac gat 459
 Leu Leu Asp Leu Leu Asp Glu Pro Ile Pro Gly Val Gly Thr Tyr Asp
 15 20 25
 gat ttc cat act att gac tgg gtg cga gag aag tgt aag gac aga gaa 507
 Asp Phe His Thr Ile Asp Trp Val Arg Glu Lys Cys Lys Asp Arg Glu
 30 35 40
 agg cac aga cgg atc aac agt aaa aaa aaa gaa tca gca tgg gaa atg 555
 Arg His Arg Arg Ile Asn Ser Lys Lys Lys Glu Ser Ala Trp Glu Met
 45 50 55 60
 aca aaa agt ctg tat gac gcc tgg tca gga tgg ctt gtc gtt aca ctg 603
 Thr Lys Ser Leu Tyr Asp Ala Trp Ser Gly Trp Leu Val Val Thr Leu
 65 70 75
 acg gga ctg gca tca ggg gca cta gct gga ttg ata gac att gct gct 651
 Thr Gly Leu Ala Ser Gly Ala Leu Ala Gly Leu Ile Asp Ile Ala Ala
 80 85 90

gac Asp	tg Trp	atg Met	act Thr	gac Asp	ctg Leu	aag Lys	gag Glu	ggc Gly	atc Ile	tgc Cys	ctc Leu	agt Ser	gca Ala	ttg Leu	tg Trp	699
		95					100					105				
tac Tyr	aac Asn	cat His	gaa Glu	cag Gln	tgt Cys	tgt Cys	tg Trp	ggc Gly	tct Ser	aat Asn	gag Glu	aca Thr	acg Thr	ttt Phe	gaa Glu	747
	110					115					120					
gag Glu	agg Arg	gat Asp	aaa Lys	tgt Cys	cca Pro	cag Gln	tg Trp	aaa Lys	aca Thr	tg Trp	gca Ala	gag Glu	tta Leu	atc Ile	att Ile	795
125					130					135					140	
ggc Gly	caa Gln	gca Ala	gag Glu	ggc Gly	cct Pro	gga Gly	tct Ser	tat Tyr	atc Ile	atg Met	aac Asn	tac Tyr	atc Ile	atg Met	tat Tyr	843
				145					150					155		
atc Ile	ttt Phe	tg Trp	gct Ala	ttg Leu	agt Ser	ttt Phe	gcc Ala	ttt Phe	ctt Leu	gca Ala	gtt Val	tct Ser	ttg Leu	gtg Val	aaa Lys	891
			160					165					170			
gta Val	ttt Phe	gct Ala	cca Pro	tat Tyr	gcc Ala	tgt Cys	ggc Gly	tct Ser	gga Gly	att Ile	cca Pro	gag Glu	att Ile	aaa Lys	act Thr	939
		175					180					185				
att Ile	ttg Leu	agt Ser	gga Gly	ttt Phe	atc Ile	atc Ile	aga Arg	gga Gly	tac Tyr	ttg Leu	gga Gly	aaa Lys	tg Trp	act Thr	tta Leu	987
	190					195					200					
atg Met	att Ile	aaa Lys	act Thr	atc Ile	acg Thr	tta Leu	gtg Val	ctg Leu	gct Ala	gtg Val	gca Ala	tca Ser	gg Gly	ttg Leu	agt Ser	1035
205					210					215				220		
tta Leu	gga Gly	aaa Lys	gaa Glu	gg Gly	ccc Pro	ctg Leu	gta Val	cat His	gtt Val	gcc Ala	tgc Cys	tgc Cys	tgt Cys	gga Gly	aat Asn	1083
			225						230					235		
atc Ile	ttt Phe	tcc Ser	tac Tyr	ctc Leu	ttt Phe	cca Pro	aag Lys	tat Tyr	agc Ser	acc Thr	aat Asn	gaa Glu	gct Ala	aaa Lys	aag Lys	1131
			240					245					250			
agg Arg	gag Glu	gtg Val	ctg Leu	tca Ser	gcc Ala	gcc Ala	tca Ser	gct Ala	gct Ala	ggg Gly	gtt Val	tct Ser	gtg Val	gct Ala	ttt Phe	1179
	255					260						265				
gg Gly	gca Ala	ccg Pro	atc Ile	gga Gly	gga Gly	gtt Val	ctt Leu	ttt Phe	agc Ser	ttg Leu	gag Glu	gag Glu	gtt Val	agc Ser	tat Tyr	1227
	270					275					280					
tat Tyr	ttt Phe	cct Pro	ctc Leu	aaa Lys	act Thr	tta Leu	tg Trp	aga Arg	tca Ser	ttt Phe	ttt Phe	gct Ala	gct Ala	ttg Leu	gtg Val	1275
285					290					295				300		
gca Ala	gca Ala	ttt Phe	gtt Val	ttg Leu	aga Arg	tcc Ser	atc Ile	aat Asn	cca Pro	ttt Phe	gg Gly	aac Asn	agc Ser	cgt Arg	ctg Leu	1323
			305						310					315		
gtc Val	ctc Leu	ttt Phe	tat Tyr	gtg Val	gag Glu	tat Tyr	cat His	aca Thr	cca Pro	tg Trp	tac Tyr	ctt Leu	ttt Phe	gaa Glu	ctg Leu	1371
			320					325					330			
ttt Phe	cct Pro	ttt Phe	att Ile	ctc Leu	cta Leu	ggg Gly	gta Val	ttt Phe	gga Gly	ggg Gly	ctt Leu	tg Trp	gga Gly	gct Ala	ttt Phe	1419
	335						340					345				
ttt Phe	att Ile	agg Arg	gca Ala	aat Asn	att Ile	gcc Ala	tg Trp	tgt Cys	cgt Arg	cga Arg	cgc Arg	aag Lys	tcc Ser	acc Thr	aaa Lys	1467
	350					355					360					
ttt Gly	gga Gly	aag Gly	tat Gly	cct Gly	gtt Gly	ctc Gly	gaa Gly	gtc Gly	att Gly	att Gly	gtt Gly	gca Gly	gcc Gly	att Gly	act Gly	1515

Phe 365	Gly	Lys	Tyr	Pro	Val 370	Leu	Glu	Val	Ile	Ile 375	Val	Ala	Ala	Ile	Thr 380	
gct Ala	gtg Val	ata Ile	gcc Ala	ttc Phe 385	ccc Pro	aac Asn	cca Pro	tac Tyr	aca Thr 390	agg Arg	ctc Leu	aac Asn	acc Thr	agt Ser 395	gaa Glu	1563
ctg Leu	att Ile	aaa Lys	gag Glu 400	ctg Leu	ttt Phe	aca Thr	gat Asp	tgt Cys 405	ggg Gly	ccg Pro	ttg Leu	gaa Glu	tcc Ser 410	tcc Ser	tct Ser	1611
ctc Leu	tgt Cys	gac Asp 415	tac Tyr	aga Arg	aat Asn	gac Asp	atg Met 420	aat Asn	gcc Ala	agt Ser	aaa Lys	att Ile 425	gtt Val	gac Asp	gat Asp	1659
att Ile	cct Pro 430	gac Asp	cgt Arg	cca Pro	gca Ala	ggc Gly 435	gtt Val	gga Gly	gta Val	tat Tyr	tca Ser 440	gct Ala	atc Ile	tgg Trp	cag Gln	1707
ttg Leu 445	tgc Cys	cta Leu	gcg Ala	ctc Leu	ata Ile 450	ttt Phe	aaa Lys	ata Ile	ata Ile	atg Met 455	aca Thr	gta Val	ttc Phe	act Thr	ttt Phe 460	1755
ggg Gly	atc Ile	aag Lys	gtc Val	ccg Pro	tca Ser	ggc Gly	ttg Leu	ttt Phe	atc Ile 470	ccc Pro	agc Ser	atg Met	gcc Ala	att Ile 475	gga Gly	1803
gcc Ala	att Ile	gca Ala	ggg Gly 480	aga Arg	att Ile	gtg Val	ggg Gly	atc Ile 485	gct Ala	gtg Val	gag Glu	cag Gln	ctt Leu 490	gcc Ala	tac Tyr	1851
tat Tyr	cac His	cac His 495	gac Asp	tgg Trp	ttt Phe	atc Ile	ttc Phe 500	aag Lys	gag Glu	tgg Trp	tgt Cys	gag Glu	gtt Val	ggg Gly	gct Ala	1899
gac Asp	tgc Cys 510	atc Ile	act Thr	ccc Pro	ggg Gly	ctg Leu 515	tat Tyr	gcc Ala	atg Met	gtt Val	ggg Gly	gct Ala	gct Ala	gcg Ala	tgc Cys	1947
tta Leu 525	ggt Gly	ggt Gly	gtg Val	aca Thr	aga Arg	atg Met	act Thr	gtg Val	tct Ser	ctg Leu 535	gtg Val	gtt Val	att Ile	gtt Val	ttt Phe 540	1995
gaa Glu	ctt Leu	act Thr	gga Gly	ggc Gly	ttg Leu	gaa Glu	tat Tyr	att Ile	gtt Val 550	cct Pro	ctt Leu	atg Met	gct Ala	gca Ala	gta Val	2043
atg Met	acc Thr	agt Ser	aaa Lys 560	tgg Trp	gtt Val	ggt Gly	gat Asp	gcc Ala 565	ttt Phe	ggt Gly	agg Arg	gaa Glu	ggg Gly	att Ile	tat Tyr	2091
gaa Glu	gca Ala	cac His 575	atc Ile	cga Arg	cta Leu	aat Asn	ggg Gly 580	tac Tyr	cct Pro	ttc Phe	ttg Leu	gat Asp 585	gca Ala	aaa Lys	gaa Glu	2139
gaa Glu	ttc Phe 590	act Thr	cat His	aca Thr	acc Thr	ctg Leu 595	gct Ala	gct Ala	gat Asp	gtt Val	atg Met	aga Arg	cct Pro	cga Arg	aga Arg	2187
agt Ser 605	gac Asp	cct Pro	ccc Pro	tta Leu	gct Ala	gtt Val	ttg Leu	aca Thr	cag Gln	gac Asp 615	aat Asn	atg Met	aca Thr	gta Val	gat Asp 620	2235
gac Asp	ata Ile	gaa Glu	aac Asn	atg Met	att Ile	aat Asn	gaa Glu	acc Thr	agc Ser 630	tat Tyr	aat Asn	ggc Gly	ttt Phe	cct Pro	gtt Val	2283
ata	atg	tca	aaa	gaa	tct	cag	aga	tta	gtg	gga	ttt	gcc	ctc	aga	aga	2331

Ile	Met	Ser	Lys	Glu	Ser	Gln	Arg	Leu	Val	Gly	Phe	Ala	Leu	Arg	Arg		
			640					645					650				
gac	ctg	act	att	gca	ata	gaa	agt	gcc	aga	aaa	aaa	caa	gaa	ggg	att	2379	
Asp	Leu	Thr	Ile	Ala	Ile	Glu	Ser	Ala	Arg	Lys	Lys	Gln	Glu	Gly	Ile		
		655					660					665					
gtt	ggc	agt	tct	cgg	gtg	tgt	ttt	gca	cag	cat	act	cca	tct	ctt	cca	2427	
Val	Gly	Ser	Ser	Arg	Val	Cys	Phe	Ala	Gln	His	Thr	Pro	Ser	Leu	Pro		
	670					675					680						
gca	gaa	agt	cca	cgg	cca	tta	aaa	ctg	aga	agc	atc	ctt	gac	atg	agc	2475	
Ala	Glu	Ser	Pro	Arg	Pro	Leu	Lys	Leu	Arg	Ser	Ile	Leu	Asp	Met	Ser		
	685				690					695					700		
cct	ttt	aca	gtg	aca	gac	cac	acc	cca	atg	gag	att	gtg	gta	gac	atc	2523	
Pro	Phe	Thr	Val	Thr	Asp	His	Thr	Pro	Met	Glu	Ile	Val	Val	Asp	Ile		
			705						710					715			
ttt	cga	aag	ctt	ggg	ctg	agg	cag	tgc	ctt	gta	act	cac	aac	gga	cgc	2571	
Phe	Arg	Lys	Leu	Gly	Leu	Arg	Gln	Cys	Leu	Val	Thr	His	Asn	Gly	Arg		
			720					725					730				
ctc	ctt	ggc	att	ata	aca	aaa	aaa	gat	atc	ctc	cgt	cat	atg	gcc	cag	2619	
Leu	Leu	Gly	Ile	Ile	Thr	Lys	Lys	Asp	Ile	Leu	Arg	His	Met	Ala	Gln		
		735					740					745					
acg	gca	aac	caa	gac	ccc	gct	tca	ata	atg	ttc	aac	tga	gtcctgtaga			2668	
Thr	Ala	Asn	Gln	Asp	Pro	Ala	Ser	Ile	Met	Phe	Asn						
	750					755					760						
tgaggacaga	gaggagacag	aagaggaagt	tcgtttgttg	aatagcacia	ttctttaatc											2728	
tgcgggactc	gtccactttt	ttctttctttc														2758	

<210> 4
 <211> 760
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 4																	
Met	Thr	Asn	Gly	Gly	Ser	Ile	Asn	Ser	Ser	Thr	His	Leu	Leu	Asp	Leu		
1				5					10					15			
Leu	Asp	Glu	Pro	Ile	Pro	Gly	Val	Gly	Thr	Tyr	Asp	Asp	Phe	His	Thr		
		20						25					30				
Ile	Asp	Trp	Val	Arg	Glu	Lys	Cys	Lys	Asp	Arg	Glu	Arg	His	Arg	Arg		
		35					40					45					
Ile	Asn	Ser	Lys	Lys	Lys	Glu	Ser	Ala	Trp	Glu	Met	Thr	Lys	Ser	Leu		
	50					55					60						
Tyr	Asp	Ala	Trp	Ser	Gly	Trp	Leu	Val	Val	Thr	Leu	Thr	Gly	Leu	Ala		
	65				70					75					80		
Ser	Gly	Ala	Leu	Ala	Gly	Leu	Ile	Asp	Ile	Ala	Ala	Asp	Trp	Met	Thr		
			85						90					95			
Asp	Leu	Lys	Glu	Gly	Ile	Cys	Leu	Ser	Ala	Leu	Trp	Tyr	Asn	His	Glu		
			100					105					110				
Gln	Cys	Cys	Trp	Gly	Ser	Asn	Glu	Thr	Thr	Phe	Glu	Glu	Arg	Asp	Lys		
		115					120					125					
Cys	Pro	Gln	Trp	Lys	Thr	Trp	Ala	Glu	Leu	Ile	Ile	Gly	Gln	Ala	Glu		
	130					135					140						
Gly	Pro	Gly	Ser	Tyr	Ile	Met	Asn	Tyr	Ile	Met	Tyr	Ile	Phe	Trp	Ala		
	145				150				155					160			
Leu	Ser	Phe	Ala	Phe	Leu	Ala	Val	Ser	Leu	Val	Lys	Val	Phe	Ala	Pro		
			165						170					175			
Tyr	Ala	Cys	Gly	Ser	Gly	Ile	Pro	Glu	Ile	Lys	Thr	Ile	Leu	Ser	Gly		
			180					185					190				
Phe	Ile	Ile	Arg	Gly	Tyr	Leu	Gly	Lys	Trp	Thr	Leu	Met	Ile	Lys	Thr		
		195					200					205					

Ile	Thr	Leu	Val	Leu	Ala	Val	Ala	Ser	Gly	Leu	Ser	Leu	Gly	Lys	Glu
	210					215					220				
Gly	Pro	Leu	Val	His	Val	Ala	Cys	Cys	Cys	Gly	Asn	Ile	Phe	Ser	Tyr
225					230					235					240
Leu	Phe	Pro	Lys	Tyr	Ser	Thr	Asn	Glu	Ala	Lys	Lys	Arg	Glu	Val	Leu
				245					250					255	
Ser	Ala	Ala	Ser	Ala	Ala	Gly	Val	Ser	Val	Ala	Phe	Gly	Ala	Pro	Ile
			260					265					270		
Gly	Gly	Val	Leu	Phe	Ser	Leu	Glu	Glu	Val	Ser	Tyr	Tyr	Phe	Pro	Leu
		275					280					285			
Lys	Thr	Leu	Trp	Arg	Ser	Phe	Phe	Ala	Ala	Leu	Val	Ala	Ala	Phe	Val
	290					295					300				
Leu	Arg	Ser	Ile	Asn	Pro	Phe	Gly	Asn	Ser	Arg	Leu	Val	Leu	Phe	Tyr
305					310					315					320
Val	Glu	Tyr	His	Thr	Pro	Trp	Tyr	Leu	Phe	Glu	Leu	Phe	Pro	Phe	Ile
				325					330					335	
Leu	Leu	Gly	Val	Phe	Gly	Gly	Leu	Trp	Gly	Ala	Phe	Phe	Ile	Arg	Ala
			340					345					350		
Asn	Ile	Ala	Trp	Cys	Arg	Arg	Arg	Lys	Ser	Thr	Lys	Phe	Gly	Lys	Tyr
		355					360					365			
Pro	Val	Leu	Glu	Val	Ile	Ile	Val	Ala	Ala	Ile	Thr	Ala	Val	Ile	Ala
	370					375					380				
Phe	Pro	Asn	Pro	Tyr	Thr	Arg	Leu	Asn	Thr	Ser	Glu	Leu	Ile	Lys	Glu
385					390					395					400
Leu	Phe	Thr	Asp	Cys	Gly	Pro	Leu	Glu	Ser	Ser	Ser	Leu	Cys	Asp	Tyr
				405					410					415	
Arg	Asn	Asp	Met	Asn	Ala	Ser	Lys	Ile	Val	Asp	Asp	Ile	Pro	Asp	Arg
			420					425					430		
Pro	Ala	Gly	Val	Gly	Val	Tyr	Ser	Ala	Ile	Trp	Gln	Leu	Cys	Leu	Ala
		435					440					445			
Leu	Ile	Phe	Lys	Ile	Ile	Met	Thr	Val	Phe	Thr	Phe	Gly	Ile	Lys	Val
	450					455					460				
Pro	Ser	Gly	Leu	Phe	Ile	Pro	Ser	Met	Ala	Ile	Gly	Ala	Ile	Ala	Gly
465					470					475					480
Arg	Ile	Val	Gly	Ile	Ala	Val	Glu	Gln	Leu	Ala	Tyr	Tyr	His	His	Asp
				485					490					495	
Trp	Phe	Ile	Phe	Lys	Glu	Trp	Cys	Glu	Val	Gly	Ala	Asp	Cys	Ile	Thr
			500					505					510		
Pro	Gly	Leu	Tyr	Ala	Met	Val	Gly	Ala	Ala	Ala	Cys	Leu	Gly	Gly	Val
		515					520					525			
Thr	Arg	Met	Thr	Val	Ser	Leu	Val	Val	Ile	Val	Phe	Glu	Leu	Thr	Gly
	530					535					540				
Gly	Leu	Glu	Tyr	Ile	Val	Pro	Leu	Met	Ala	Ala	Val	Met	Thr	Ser	Lys
545					550					555					560
Trp	Val	Gly	Asp	Ala	Phe	Gly	Arg	Glu	Gly	Ile	Tyr	Glu	Ala	His	Ile
				565					570					575	
Arg	Leu	Asn	Gly	Tyr	Pro	Phe	Leu	Asp	Ala	Lys	Glu	Glu	Phe	Thr	His
			580					585					590		
Thr	Thr	Leu	Ala	Ala	Asp	Val	Met	Arg	Pro	Arg	Arg	Ser	Asp	Pro	Pro
		595					600					605			
Leu	Ala	Val	Leu	Thr	Gln	Asp	Asn	Met	Thr	Val	Asp	Asp	Ile	Glu	Asn
		610				615					620				
Met	Ile	Asn	Glu	Thr	Ser	Tyr	Asn	Gly	Phe	Pro	Val	Ile	Met	Ser	Lys
625					630					635					640
Glu	Ser	Gln	Arg	Leu	Val	Gly	Phe	Ala	Leu	Arg	Arg	Asp	Leu	Thr	Ile
				645					650				655		
Ala	Ile	Glu	Ser	Ala	Arg	Lys	Lys	Gln	Glu	Gly	Ile	Val	Gly	Ser	Ser
			660					665					670		
Arg	Val	Cys	Phe	Ala	Gln	His	Thr	Pro	Ser	Leu	Pro	Ala	Glu	Ser	Pro
		675					680					685			
Arg	Pro	Leu	Lys	Leu	Arg	Ser	Ile	Leu	Asp	Met	Ser	Pro	Phe	Thr	Val
	690					695					700				
Thr	Asp	His	Thr	Pro	Met	Glu	Ile	Val	Val	Asp	Ile	Phe	Arg	Lys	Leu
705					710					715					720
Gly	Leu	Arg	Gln	Cys	Leu	Val	Thr	His	Asn	Gly	Arg	Leu	Leu	Gly	Ile
				725					730					735	
Ile	Thr	Lys	Lys	Asp	Ile	Leu	Arg	His	Met	Ala	Gln	Thr	Ala	Asn	Gln
			740					745					750		

Asp Pro Ala Ser Ile Met Phe Asn
755 760

<210> 5
<211> 2588
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> gene
<222> (1)..(2588)
<223> CLCN4

<220>
<221> CDS
<222> (51)..(2051)
<223> CLC-4

<300>
<308> GenBank/XM_010391 GI:11421729

<400> 5
tactttcttcc aggcaccttg gctgggggtca tcgatctcgc cgtggactgg atg acg 56
Met Thr
1

gac ctg aag gag ggg gtc tgc ctg tct gcc ttc tgg tat agc cat gag 104
Asp Leu Lys Glu Gly Val Cys Leu Ser Ala Phe Trp Tyr Ser His Glu
5 10 15

cag tgt tgc tgg act tct aac gag acc act ttt gag gac aga gac aag 152
Gln Cys Cys Trp Thr Ser Asn Glu Thr Thr Phe Glu Asp Arg Asp Lys
20 25 30

tgt ccc ctg tgg cag aaa tgg tgc gag ctg ctg gtg aat cag tca gag 200
Cys Pro Leu Trp Gln Lys Trp Ser Glu Leu Leu Val Asn Gln Ser Glu
35 40 45 50

ggt gcc agt gct tac att ctg aat tac tta atg tac atc cta tgg gcg 248
Gly Ala Ser Ala Tyr Ile Leu Asn Tyr Leu Met Tyr Ile Leu Trp Ala
55 60 65

ctg ctg ttt gca ttt ttg gct gtc tcc ctg gtg cgt gta ttt gca cca 296
Leu Leu Phe Ala Phe Leu Ala Val Ser Leu Val Arg Val Phe Ala Pro
70 75 80

tat gcc tgt ggc tct ggc ata cca gag ata aag acc att ttg agc ggc 344
Tyr Ala Cys Gly Ser Gly Ile Pro Glu Ile Lys Thr Ile Leu Ser Gly
85 90 95

ttt atc atc agg ggc tac ttg ggg aag tgg acc ctg cta atc aag aca 392
Phe Ile Ile Arg Gly Tyr Leu Gly Lys Trp Thr Leu Leu Ile Lys Thr
100 105 110

gtc acg ctg gtg ctg gta gtg tcc tcc ggt ctg agc ctt ggg aag gaa 440
Val Thr Leu Val Leu Val Val Ser Ser Gly Leu Ser Leu Gly Lys Glu
115 120 125 130

ggg ccg cta gtg cac gtg gct tgt tgc tgt ggc aac ttc ttc agc agc 488
Gly Pro Leu Val His Val Ala Cys Cys Cys Gly Asn Phe Phe Ser Ser
135 140 145

ctt ttc tcc aag tac agc aag aat gag ggc aag agg cgg gag gtg ctt 536
Leu Phe Ser Lys Tyr Ser Lys Asn Glu Gly Lys Arg Arg Glu Val Leu
150 155 160

tca gct gca gcg gct gct gga gtc tct gtt gcc ttt ggt gca cca att 584

Ser	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Gly	Val	Ser	Val	Ala	Phe	Gly	Ala	Pro	Ile	
		165					170					175				
gga	ggc	gtg	ctt	ttc	agt	cta	gaa	gag	gtc	agt	tac	tac	ttt	ccc	ctg	632
Gly	Gly	Val	Leu	Phe	Ser	Leu	Glu	Glu	Val	Ser	Tyr	Tyr	Phe	Pro	Leu	
	180					185					190					
aag	acc	ttg	tgg	agg	tca	ttt	ttc	gca	gcc	ctg	gtg	gcg	gcc	ttt	acg	680
Lys	Thr	Leu	Trp	Arg	Ser	Phe	Phe	Ala	Ala	Leu	Val	Ala	Ala	Phe	Thr	
195					200					205					210	
ctg	aga	tcc	atc	aat	ccc	ttt	ggg	aat	agc	cgt	ctc	gtt	ctc	ttt	tat	728
Leu	Arg	Ser	Ile	Asn	Pro	Phe	Gly	Asn	Ser	Arg	Leu	Val	Leu	Phe	Tyr	
				215					220					225		
gtg	gaa	tac	cac	acg	ccc	tgg	tac	atg	gct	gaa	ctc	ttc	ccc	ttc	atc	776
Val	Glu	Tyr	His	Thr	Pro	Trp	Tyr	Met	Ala	Glu	Leu	Phe	Pro	Phe	Ile	
			230					235					240			
ctg	ctt	ggg	gtc	ttc	ggg	ggc	ttg	tgg	gga	acc	ctc	ttc	atc	cgc	tgc	824
Leu	Leu	Gly	Val	Phe	Gly	Gly	Leu	Trp	Gly	Thr	Leu	Phe	Ile	Arg	Cys	
		245					250					255				
aac	atc	gcc	tgg	tgc	agg	agg	cgc	aag	acc	acc	agg	ctg	ggg	aag	tac	872
Asn	Ile	Ala	Trp	Cys	Arg	Arg	Arg	Lys	Thr	Thr	Arg	Leu	Gly	Lys	Tyr	
	260					265					270					
ccg	gtg	ctg	gag	gtc	att	gtg	gtg	act	gcc	atc	act	gcc	atc	att	gcc	920
Pro	Val	Leu	Glu	Val	Ile	Val	Val	Thr	Ala	Ile	Thr	Ala	Ile	Ile	Ala	
275					280					285					290	
tac	ccc	aat	ccc	tac	aca	cgc	cag	agc	acc	agc	gag	ctc	att	tct	gag	968
Tyr	Pro	Asn	Pro	Tyr	Thr	Arg	Gln	Ser	Thr	Ser	Glu	Leu	Ile	Ser	Glu	
				295					300					305		
ctg	ttc	aat	gac	tgt	gga	gcc	ctt	gag	tct	tcc	cag	ctc	tgt	gac	tac	1016
Leu	Phe	Asn	Asp	Cys	Gly	Ala	Leu	Glu	Ser	Ser	Gln	Leu	Cys	Asp	Tyr	
			310					315					320			
atc	aat	gac	ccc	aac	atg	act	cgg	cct	gtg	gat	gac	att	cca	gac	cgg	1064
Ile	Asn	Asp	Pro	Asn	Met	Thr	Arg	Pro	Val	Asp	Asp	Ile	Pro	Asp	Arg	
		325					330					335				
ccg	gct	ggt	gtc	ggt	gtt	tac	acg	gcc	atg	tgg	cag	ctg	gcc	ctg	gca	1112
Pro	Ala	Gly	Val	Gly	Val	Tyr	Thr	Ala	Met	Trp	Gln	Leu	Ala	Leu	Ala	
	340					345					350					
ctg	atc	ttc	aaa	atc	gtc	gtt	acc	ata	ttt	acc	ttt	ggc	atg	aag	atc	1160
Leu	Ile	Phe	Lys	Ile	Val	Val	Thr	Ile	Phe	Thr	Phe	Gly	Met	Lys	Ile	
355					360					365					370	
ccg	tcg	ggc	ctc	ttc	atc	ccc	agc	atg	gct	gtg	ggc	gcg	ata	gcg	ggc	1208
Pro	Ser	Gly	Leu	Phe	Ile	Pro	Ser	Met	Ala	Val	Gly	Ala	Ile	Ala	Gly	
				375					380					385		
agg	atg	gtg	gga	att	ggc	gtg	gag	cag	ctg	gcc	tac	cat	cac	cat	gac	1256
Arg	Met	Val	Gly	Ile	Gly	Val	Glu	Gln	Leu	Ala	Tyr	His	His	His	Asp	
			390					395					400			
tgg	atc	atc	ttc	agg	aac	tgg	tgc	aga	ccc	ggt	gca	gac	tgt	gtc	acg	1304
Trp	Ile	Ile	Phe	Arg	Asn	Trp	Cys	Arg	Pro	Gly	Ala	Asp	Cys	Val	Thr	
		405					410					415				
cca	ggg	ctg	tac	gca	atg	gtg	gga	gct	gcg	gcc	tgc	ctc	ggt	gga	gtt	1352
Pro	Gly	Leu	Tyr	Ala	Met	Val	Gly	Ala	Ala	Ala	Cys	Leu	Gly	Gly	Val	
	420					425					430					
acc	agg	atg	acg	gtg	tca	ttg	gtg	gtc	atc	atg	ttt	gaa	tta	acc	ggg	1400



agaaactttt actccttctg ctcaaggctg atgtttgtaa cttatgaaca cacgtgaagt 2431
gttgagtcca aaagacaaag gggcatcggc atgtcagcgt ccttatttat tggttcttga 2491
agttttgctg ctatgttact gaatcataact aaagacattt gcgcttactt tgttgaaaaa 2551
gaaaaagaaa ttaaatgtga acacagtgaag agctgca 2588

<210> 6
<211> 666
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6
Met Thr Asp Leu Lys Glu Gly Val Cys Leu Ser Ala Phe Trp Tyr Ser
1 5 10 15
His Glu Gln Cys Cys Trp Thr Ser Asn Glu Thr Thr Phe Glu Asp Arg
20 25 30
Asp Lys Cys Pro Leu Trp Gln Lys Trp Ser Glu Leu Leu Val Asn Gln
35 40 45
Ser Glu Gly Ala Ser Ala Tyr Ile Leu Asn Tyr Leu Met Tyr Ile Leu
50 55 60
Trp Ala Leu Leu Phe Ala Phe Leu Ala Val Ser Leu Val Arg Val Phe
65 70 75 80
Ala Pro Tyr Ala Cys Gly Ser Gly Ile Pro Glu Ile Lys Thr Ile Leu
85 90 95
Ser Gly Phe Ile Ile Arg Gly Tyr Leu Gly Lys Trp Thr Leu Ile Ile
100 105 110
Lys Thr Val Thr Leu Val Leu Val Val Ser Ser Gly Leu Ser Leu Gly
115 120 125
Lys Glu Gly Pro Leu Val His Val Ala Cys Cys Cys Gly Asn Phe Phe
130 135 140
Ser Ser Leu Phe Ser Lys Tyr Ser Lys Asn Glu Gly Lys Arg Arg Glu
145 150 155 160
Val Leu Ser Ala Ala Ala Ala Gly Val Ser Val Ala Phe Gly Ala
165 170 175
Pro Ile Gly Gly Val Leu Phe Ser Leu Glu Glu Val Ser Tyr Tyr Phe
180 185 190
Pro Leu Lys Thr Leu Trp Arg Ser Phe Phe Ala Ala Leu Val Ala Ala
195 200 205
Phe Thr Leu Arg Ser Ile Asn Pro Phe Gly Asn Ser Arg Leu Val Leu
210 215 220
Phe Tyr Val Glu Tyr His Thr Pro Trp Tyr Met Ala Glu Leu Phe Pro
225 230 235 240
Phe Ile Leu Leu Gly Val Phe Gly Gly Leu Trp Gly Thr Leu Phe Ile
245 250 255
Arg Cys Asn Ile Ala Trp Cys Arg Arg Lys Thr Thr Arg Leu Gly
260 265 270
Lys Tyr Pro Val Leu Glu Val Ile Val Val Thr Ala Ile Thr Ala Ile
275 280 285
Ile Ala Tyr Pro Asn Pro Tyr Thr Arg Gln Ser Thr Ser Glu Leu Ile
290 295 300
Ser Glu Leu Phe Asn Asp Cys Gly Ala Leu Glu Ser Ser Gln Leu Cys
305 310 315 320
Asp Tyr Ile Asn Asp Pro Asn Met Thr Arg Pro Val Asp Asp Ile Pro
325 330 335
Asp Arg Pro Ala Gly Val Gly Val Tyr Thr Ala Met Trp Gln Leu Ala
340 345 350
Leu Ala Leu Ile Phe Lys Ile Val Val Thr Ile Phe Thr Phe Gly Met
355 360 365
Lys Ile Pro Ser Gly Leu Phe Ile Pro Ser Met Ala Val Gly Ala Ile
370 375 380
Ala Gly Arg Met Val Gly Ile Gly Val Glu Gln Leu Ala Tyr His His
385 390 395 400
His Asp Trp Ile Ile Phe Arg Asn Trp Cys Arg Pro Gly Ala Asp Cys
405 410 415
Val Thr Pro Gly Leu Tyr Ala Met Val Gly Ala Ala Ala Cys Leu Gly
420 425 430

Gly	Val	Thr	Arg	Met	Thr	Val	Ser	Leu	Val	Val	Ile	Met	Phe	Glu	Leu
		435					440				445				
Thr	Gly	Gly	Leu	Glu	Tyr	Ile	Val	Pro	Leu	Met	Ala	Ala	Ala	Val	Thr
	450					455					460				
Ser	Lys	Trp	Val	Ala	Asp	Ala	Phe	Gly	Lys	Glu	Gly	Ile	Tyr	Glu	Ala
465					470					475				480	
His	Ile	His	Leu	Asn	Gly	Tyr	Pro	Phe	Leu	Asp	Val	Lys	Asp	Glu	Phe
				485						490				495	
Thr	His	Arg	Thr	Leu	Ala	Thr	Asp	Val	Met	Arg	Pro	Arg	Arg	Gly	Glu
			500					505					510		
Pro	Pro	Leu	Ser	Val	Leu	Thr	Gln	Asp	Ser	Met	Thr	Val	Glu	Asp	Val
		515					520					525			
Glu	Thr	Leu	Ile	Lys	Glu	Thr	Asp	Tyr	Asn	Gly	Phe	Pro	Val	Val	Val
	530					535					540				
Ser	Arg	Asp	Ser	Glu	Arg	Leu	Ile	Gly	Phe	Ala	Gln	Arg	Arg	Glu	Leu
545					550					555				560	
Ile	Leu	Ala	Ile	Lys	Asn	Ala	Arg	Gln	Arg	Gln	Glu	Gly	Ile	Val	Ser
				565				570						575	
Asn	Ser	Ile	Met	Tyr	Phe	Thr	Glu	Glu	Pro	Pro	Glu	Leu	Pro	Ala	Asn
			580					585					590		
Ser	Pro	His	Pro	Leu	Lys	Leu	Arg	Arg	Ile	Leu	Asn	Leu	Ser	Pro	Phe
		595					600					605			
Thr	Val	Thr	Asp	His	Thr	Pro	Met	Glu	Thr	Val	Val	Asp	Ile	Phe	Arg
	610					615					620				
Lys	Leu	Gly	Leu	Arg	Gln	Cys	Leu	Val	Thr	Arg	Ser	Gly	Arg	Leu	Leu
625					630					635				640	
Gly	Ile	Ile	Thr	Lys	Lys	Asp	Val	Leu	Arg	His	Met	Ala	Gln	Met	Ala
				645					650					655	
Asn	Gln	Asp	Pro	Glu	Ser	Ile	Met	Phe	Asn						
			660					665							

<210> 7
 <211> 2739
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> gene
 <222> (1)..(2739)
 <223> Clcn4-2

<220>
 <221> CDS
 <222> (378)..(2621)
 <223> Clc 4-2

<300>
 <303> Nat. Genet.
 <304> 1995
 <305> 10 (4)
 <306> 466-471
 <308> GenBank/NM_011334 GI:6755425

<400> 7
 taaatgtgac ttaataaatg gtgcaaaatt aaattttatt gcttgaggac agacgggcat 60
 aaaggaaggg aaaagacatt taatgtaaag gcaacaacaa caacaacaaa actgtcccgg 120
 atgaggaagg catttaagtc atttcagcca agctgaacac ggagacaggg ggatgacgct 180
 gaacacttgc cccgccccgc ctgcctgcct gtcacccgcc tcgcatgac gtcacacgac 240
 ctgccgcaga cagccgcgct gaagagagga ggatgatcta ggacgctgtc cgggtggacg 300
 gccacgccgc aagacgcggc cctgcaggag tgactagcac ggtcagggcg ggagccacga 360

gcgcctctctgg	gaacctc	atg	gac	ttc	ctc	gag	gag	ccc	ttc	cct	gac	gtg	410
		Met	Asp	Phe	Leu	Glu	Glu	Pro	Phe	Pro	Asp	Val	
		1				5					10		
ggg	acc	tac	gag	gac	ttc	cac	acc	ata	gac	tgg	ctg	agg	458
Gly	Thr	Tyr	Glu	Asp	Phe	His	Thr	Ile	Asp	Trp	Leu	Arg	
			15					20				25	
cgg	gat	acc	gac	aga	cat	agg	aag	atc	acc	agc	aaa	agt	506
Arg	Asp	Thr	Asp	Arg	His	Arg	Lys	Ile	Thr	Ser	Lys	Ser	
		30					35				40		
att	tgg	gag	ttc	atc	aag	agc	ctg	ctg	gac	gcg	tgg	tcg	554
Ile	Trp	Glu	Phe	Ile	Lys	Ser	Leu	Leu	Asp	Ala	Trp	Ser	
	45					50					55		
gtg	atg	cta	ctc	att	ggg	ctg	ctg	gca	ggg	acc	tta	gct	602
Val	Met	Leu	Leu	Ile	Gly	Leu	Leu	Ala	Gly	Thr	Leu	Ala	
	60				65					70			
gat	ctc	gct	gtg	gat	tgg	atg	acg	gac	ctc	aag	gag	ggg	650
Asp	Leu	Ala	Val	Asp	Trp	Met	Thr	Asp	Leu	Lys	Glu	Gly	
				80					85				
tcc	gca	ttc	tgg	tac	agc	cat	gaa	cag	tgc	tgt	tgg	acc	698
Ser	Ala	Phe	Trp	Tyr	Ser	His	Glu	Gln	Cys	Cys	Trp	Thr	
			95				100					105	
acc	act	ttt	gag	gac	agg	gac	aag	tgt	ccc	ctg	tgg	cag	746
Thr	Thr	Phe	Glu	Asp	Arg	Asp	Lys	Cys	Pro	Leu	Trp	Gln	
		110					115					120	
gag	ctt	ctt	ctg	agc	cag	tca	gag	ggc	gcc	agc	gct	tac	794
Glu	Leu	Leu	Leu	Ser	Gln	Ser	Glu	Gly	Ala	Ser	Ala	Tyr	
	125				130						135		
tac	tta	atg	tac	att	cta	tgg	gcg	ttg	ctg	ttt	gca	ttt	842
Tyr	Leu	Met	Tyr	Ile	Leu	Trp	Ala	Leu	Leu	Phe	Ala	Phe	
	140				145					150			
tcc	ctg	gta	cgt	gtg	ttc	gca	ccg	tat	gcc	tgt	ggc	tct	890
Ser	Leu	Val	Arg	Val	Phe	Ala	Pro	Tyr	Ala	Cys	Gly	Ser	
				160					165				
gag	ata	aag	act	att	ttg	agt	ggc	ttt	atc	atc	agg	ggc	938
Glu	Ile	Lys	Thr	Ile	Leu	Ser	Gly	Phe	Ile	Ile	Arg	Gly	
			175				180					185	
aaa	tgg	act	ctt	cta	atc	aag	act	gtc	acc	ctc	gtg	ctc	986
Lys	Trp	Thr	Leu	Leu	Ile	Lys	Thr	Val	Thr	Leu	Val	Leu	
		190					195				200		
tct	ggc	ctg	agc	ctt	ggc	aaa	gag	ggc	cca	ctg	gtg	cat	1034
Ser	Gly	Leu	Ser	Leu	Gly	Lys	Glu	Gly	Pro	Leu	Val	His	
	205				210						215		
tgc	tgt	ggc	aac	ttc	ttc	agc	agc	ctt	ttc	tcc	aag	tat	1082
Cys	Cys	Gly	Asn	Phe	Phe	Ser	Ser	Leu	Phe	Ser	Lys	Tyr	
	220				225					230			
gaa	ggc	aag	agg	cgt	gag	gtg	ctt	tca	gct	gca	gct	gct	1130
Glu	Gly	Lys	Arg	Arg	Glu	Val	Leu	Ser	Ala	Ala	Ala	Ala	
				240					245				
tct	gtg	gcc	ttt	ggg	gct	ccg	ata	gga	ggg	gtg	ctc	ttc	1178
Ser	Val	Ala	Phe	Gly	Ala	Pro	Ile	Gly	Gly	Val	Leu	Phe	
			255				260					265	
gag	gtc	agt	tac	tac	ttt	ccc	ttg	aaa	acc	ttg	tgg	agg	1226

Glu	Val	Ser	Tyr	Tyr	Phe	Pro	Leu	Lys	Thr	Leu	Trp	Arg	Ser	Phe	Phe	
		270					275					280				
cga	gcc	ctg	gtg	gct	gcc	ttc	aca	ctg	cgc	tcc	atc	aac	ccc	ttt	gga	1274
Arg	Ala	Leu	Val	Ala	Ala	Phe	Thr	Leu	Arg	Ser	Ile	Asn	Pro	Phe	Gly	
	285					290					295					
aat	agc	cgc	ctg	gtt	ctc	ttt	tac	gtg	gag	tat	cat	aca	ccc	tgg	tac	1322
Asn	Ser	Arg	Leu	Val	Leu	Phe	Tyr	Val	Glu	Tyr	His	Thr	Pro	Trp	Tyr	
300					305					310					315	
atg	gct	gaa	ctc	ttc	cct	ttc	atc	ctg	ctt	gga	gtc	ttt	ggg	ggg	tta	1370
Met	Ala	Glu	Leu	Phe	Pro	Phe	Ile	Leu	Leu	Gly	Val	Phe	Gly	Gly	Leu	
				320					325					330		
tgg	gga	acc	ctc	ttc	aca	cgc	tgc	aac	att	gct	tgg	tgc	agg	agg	cgt	1418
Trp	Gly	Thr	Leu	Phe	Thr	Arg	Cys	Asn	Ile	Ala	Trp	Cys	Arg	Arg	Arg	
			335				340						345			
aag	acc	acc	agg	ctg	ggc	agg	tac	cca	gtg	ttg	gag	gtt	att	gcg	gtg	1466
Lys	Thr	Thr	Arg	Leu	Gly	Arg	Tyr	Pro	Val	Leu	Glu	Val	Ile	Ala	Val	
		350					355					360				
aca	gcc	gtc	acc	gcc	atc	gtg	gcc	tac	ccc	aat	ccc	tac	act	cgc	cag	1514
Thr	Ala	Val	Thr	Ala	Ile	Val	Ala	Tyr	Pro	Asn	Pro	Tyr	Thr	Arg	Gln	
	365					370					375					
agc	acc	agt	gag	ctc	atc	tct	gag	ctc	ttc	aac	gat	tgt	ggg	gct	ctc	1562
Ser	Thr	Ser	Glu	Leu	Ile	Ser	Glu	Leu	Phe	Asn	Asp	Cys	Gly	Ala	Leu	
380					385					390					395	
gag	tct	tct	cag	ctc	tgt	gac	tac	atc	aac	gac	ccc	aac	atg	act	cgg	1610
Glu	Ser	Ser	Gln	Leu	Cys	Asp	Tyr	Ile	Asn	Asp	Pro	Asn	Met	Thr	Arg	
				400					405					410		
cct	gtg	gat	gac	att	ccg	gac	cgg	ccg	gct	ggg	gtt	gga	gtt	tac	aca	1658
Pro	Val	Asp	Asp	Ile	Pro	Asp	Arg	Pro	Ala	Gly	Val	Gly	Val	Tyr	Thr	
			415					420					425			
gcc	atg	tgg	cag	ctg	gcc	ttg	gca	ctg	tac	ttc	aaa	ata	gtc	att	act	1706
Ala	Met	Trp	Gln	Leu	Ala	Leu	Ala	Leu	Tyr	Phe	Lys	Ile	Val	Ile	Thr	
		430					435					440				
ata	ttt	acc	ttt	ggc	atg	aag	att	ccc	tca	ggt	ctc	ttc	atc	ccc	agt	1754
Ile	Phe	Thr	Phe	Gly	Met	Lys	Ile	Pro	Ser	Gly	Leu	Phe	Ile	Pro	Ser	
	445					450					455					
atg	gct	gtc	gga	gcc	atg	gca	ggc	cgg	atg	gtg	gga	atc	ggt	gtg	gag	1802
Met	Ala	Val	Gly	Ala	Met	Ala	Gly	Arg	Met	Val	Gly	Ile	Gly	Val	Glu	
	460				465					470					475	
cag	ctg	gcc	tac	cat	cad	cat	gac	tgg	atc	atc	ttc	agg	aac	tgg	tgc	1850
Gln	Leu	Ala	Tyr	His	His	His	Asp	Trp	Ile	Ile	Phe	Arg	Asn	Trp	Cys	
				480					485					490		
agg	cct	gga	gcg	gac	tgt	gtc	aca	cca	ggg	ctt	tat	gcg	atg	gtg	gga	1898
Arg	Pro	Gly	Ala	Asp	Cys	Val	Thr	Pro	Gly	Leu	Tyr	Ala	Met	Val	Gly	
			495					500					505			
gct	gca	gcc	tgt	cta	ggg	ggg	gtg	act	agg	atg	aca	gtg	tct	cta	gtg	1946
Ala	Ala	Ala	Cys	Leu	Gly	Gly	Val	Thr	Arg	Met	Thr	Val	Ser	Leu	Val	
		510					515					520				
gtc	att	atg	ttt	gaa	ctg	act	gga	ggg	ctg	gag	tat	att	gta	ccc	cta	1994
Val	Ile	Met	Phe	Glu	Leu	Thr	Gly	Gly	Leu	Glu	Tyr	Ile	Val	Pro	Leu	
	525					530					535					
atg	gca	gct	gct	gtc	acc	agc	aag	tgg	gtg	gct	gat	gcc	ttt	ggg	aaa	2042

Met	Ala	Ala	Ala	Val	Thr	Ser	Lys	Trp	Val	Ala	Asp	Ala	Phe	Gly	Lys		
540					545					550					555		
gaa	ggg	att	tat	gaa	gcc	cac	atc	cat	ctg	aat	ggg	tac	cca	ttt	ctt	2090	
Glu	Gly	Ile	Tyr	Glu	Ala	His	Ile	His	Leu	Asn	Gly	Tyr	Pro	Phe	Leu		
				560					565					570			
gat	gtg	aag	gat	gag	ttc	acc	cac	cgt	acg	ctg	gcc	act	gat	gtg	atg	2138	
Asp	Val	Lys	Asp	Glu	Phe	Thr	His	Arg	Thr	Leu	Ala	Thr	Asp	Val	Met		
			575					580					585				
cgg	ccc	cgg	agg	gag	gaa	ccg	cca	tta	tcg	gta	cta	acc	cag	gac	agc	2186	
Arg	Pro	Arg	Arg	Glu	Glu	Pro	Pro	Leu	Ser	Val	Leu	Thr	Gln	Asp	Ser		
		590					595					600					
atg	act	gtg	gag	gac	gtg	gag	act	ctc	atc	aag	gag	aca	gac	tac	aac	2234	
Met	Thr	Val	Glu	Asp	Val	Thr	Leu	Ile	Lys	Glu	Thr	Asp	Tyr	Asn			
	605					610				615							
ggc	ttt	cct	gtg	ctc	gtc	tcc	aga	gac	tcg	gag	cgt	ctc	atc	ggg	ttt	2282	
Gly	Phe	Pro	Val	Leu	Val	Ser	Arg	Asp	Ser	Glu	Arg	Leu	Ile	Gly	Phe		
					625					630					635		
gcc	cag	agg	cgg	gag	cta	atc	ttg	gct	ata	aaa	aat	gcc	agg	cag	agg	2330	
Ala	Gln	Arg	Arg	Glu	Leu	Ile	Leu	Ala	Ile	Lys	Asn	Ala	Arg	Gln	Arg		
				640					645					650			
caa	gag	ggc	att	gtg	agc	aat	tcc	atc	atg	tac	ttc	aca	gag	gag	cct	2378	
Gln	Glu	Gly	Ile	Val	Ser	Asn	Ser	Ile	Met	Tyr	Phe	Thr	Glu	Glu	Pro		
			655					660					665				
cct	gag	ctg	cct	gcc	aac	agc	cca	cat	cca	ctg	aag	ctg	agg	cgc	att	2426	
Pro	Glu		Pro	Ala	Asn	Ser	Pro	His	Pro	Leu	Lys	Leu	Arg	Arg	Ile		
			670				675					680					
ttc	aac	ctg	agc	cct	ttc	acg	gtc	aca	gat	cac	acc	ccc	atg	gag	acg	2474	
Phe	Asn	Leu	Ser	Pro	Phe	Thr	Val	Thr	Asp	His	Thr	Pro	Met	Glu	Thr		
			685			690					695						
gtg	gtg	gac	att	ttc	cgg	aaa	ctg	ggg	ctc	cga	caa	tgc	ctg	gtg	aca	2522	
Val	Val	Asp	Ile	Phe	Arg	Lys	Leu	Gly	Leu	Arg	Gln	Cys	Leu	Val	Thr		
					705					710					715		
cgg	agt	ggg	aga	ctt	ctt	ggg	atc	atc	aca	aaa	aag	gat	gtt	ctg	aga	2570	
Arg	Ser	Gly	Arg	Leu	Leu	Gly	Ile	Ile	Thr	Lys	Lys	Asp	Val	Leu	Arg		
				720					725					730			
cac	atg	gcc	cag	atg	gca	aac	cag	gac	cct	gaa	tcc	atc	atg	ttt	aat	2618	
His	Met	Ala	Gln	Met	Ala	Asn	Gln	Asp	Pro	Glu	Ser	Ile	Met	Phe	Asn		
			735					740					745				
tag	cacta	agatg	ggcattat	ttt	tgaga	agtca	ataattat	at	catttttaaa							2671	
gaaataacca	agtgatat	tatgat	ccta	atgaaaaaac	ttgcactgaa	ggcaaaaaaa										2731	
aaaaaaaa																2739	

<210> 8

<211> 747

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 8

Met	Asp	Phe	Leu	Glu	Glu	Pro	Phe	Pro	Asp	Val	Gly	Thr	Tyr	Glu	Asp	
1				5					10					15		
Phe	His	Thr	Ile	Asp	Trp	Leu	Arg	Glu	Lys	Ser	Arg	Asp	Thr	Asp	Arg	
			20					25					30			

His	Arg	Lys ₃₅	Ile	Thr	Ser	Lys	Ser ₄₀	Lys	Glu	Ser	Ile	Trp ₄₅	Glu	Phe	Ile
Lys	Ser	Leu	Leu	Asp	Ala	Trp	Ser ₅₅	Gly	Trp	Val	Val ₆₀	Met	Leu	Leu	Ile
Gly ₆₅	Leu	Leu	Ala	Gly	Thr ₇₀	Leu	Ala	Gly	Val	Ile ₇₅	Asp	Leu	Ala	Val	Asp ₈₀
Trp	Met	Thr	Asp	Leu ₈₅	Lys	Glu	Gly	Val	Cys ₉₀	Leu	Ser	Ala	Phe	Trp ₉₅	Tyr
Ser	His	Glu	Gln	Cys	Cys	Trp	Thr	Ser	Asn ₁₀₅	Glu	Thr	Thr	Phe	Glu	Asp
Arg	Asp	Lys ₁₁₅	Cys	Pro	Leu	Trp	Gln	Lys	Trp	Ser	Glu	Leu	Leu	Leu	Ser
Gln	Ser	Glu	Gly	Ala	Ser	Ala	Tyr	Ile	Leu	Asn	Tyr ₁₄₀	Leu	Met	Tyr	Ile
Leu	Trp	Ala	Leu	Leu	Phe	Ala	Phe	Leu	Ala	Val ₁₅₅	Ser	Leu	Val	Arg	Val ₁₆₀
Phe	Ala	Pro	Tyr	Ala	Cys	Gly	Ser	Gly	Ile	Pro	Glu	Ile	Lys	Thr	Ile ₁₇₅
Leu	Ser	Gly	Phe	Ile	Ile	Arg	Gly	Tyr	Leu	Gly	Lys	Trp	Thr	Leu	Leu
Ile	Lys	Thr	Val	Thr	Leu	Val	Leu	Val	Val	Ser	Ser	Gly	Leu	Ser	Leu
Gly	Lys	Glu	Gly	Pro	Leu	Val	His	Val	Ala	Cys	Cys ₂₂₀	Cys	Gly	Asn	Phe
Phe	Ser	Ser	Leu	Phe	Ser	Lys	Tyr	Ser	Lys	Asn ₂₃₅	Glu	Gly	Lys	Arg	Arg ₂₄₀
Glu	Val	Leu	Ser	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Gly	Val ₂₅₀	Ser	Val	Ala	Phe	Gly ₂₅₅
Ala	Pro	Ile	Gly	Val	Leu	Phe	Ser	Leu	Glu	Glu	Val	Ser	Tyr	Tyr	
Phe	Pro	Leu	Lys	Thr	Leu	Trp	Arg	Ser	Phe	Phe	Arg	Ala	Leu	Val	Ala
Ala	Phe	Thr	Leu	Arg	Ser	Ile	Asn	Pro	Phe	Gly	Asn ₃₀₀	Ser	Arg	Leu	Val
Leu	Phe	Tyr	Val	Glu	Tyr	His	Thr	Pro	Trp	Tyr	Met	Ala	Glu	Leu	Phe ₃₂₀
Pro	Phe	Ile	Leu	Leu	Gly	Val	Phe	Gly	Gly	Leu	Trp	Gly	Thr	Leu	Phe ₃₃₅
Thr	Arg	Cys	Asn	Ile	Ala	Trp	Cys	Arg	Arg	Arg	Lys	Thr	Thr	Arg	Leu
Gly	Arg	Tyr	Pro	Val	Leu	Glu	Val	Ile	Ala	Val	Thr	Ala	Val	Thr	Ala
Ile	Val	Ala	Tyr	Pro	Asn	Pro	Tyr	Thr	Arg	Gln	Ser	Thr	Ser	Glu	Leu
Ile	Ser	Glu	Leu	Phe	Asn	Asp	Cys	Gly	Ala	Leu	Glu	Ser	Ser	Gln	Leu
Cys	Asp	Tyr	Ile	Asn	Asp	Pro	Asn	Met	Thr	Arg	Pro	Val	Asp	Asp	Ile
Pro	Asp	Arg	Pro	Ala	Gly	Val	Gly	Val	Tyr	Thr	Ala	Met	Trp	Gln	Leu
Ala	Leu	Ala	Leu	Tyr	Phe	Lys	Ile	Val	Ile	Thr	Ile	Phe	Thr	Phe	Gly
Met	Lys	Ile	Pro	Ser	Gly	Leu	Phe	Ile	Pro	Ser	Met	Ala	Val	Gly	Ala
Met	Ala	Gly	Arg	Met	Val	Gly	Ile	Gly	Val	Glu	Gln	Leu	Ala	Tyr	His
His	His	Asp	Trp	Ile	Ile	Phe	Arg	Asn	Trp	Cys	Arg	Pro	Gly	Ala	Asp
Cys	Val	Thr	Pro	Gly	Leu	Tyr	Ala	Met	Val	Gly	Ala	Ala	Ala	Cys	Leu
Gly	Gly	Val	Thr	Arg	Met	Thr	Val	Ser	Leu	Val	Val	Ile	Met	Phe	Glu
Leu	Thr	Gly	Gly	Leu	Glu	Tyr	Ile	Val	Pro	Leu	Met	Ala	Ala	Ala	Val
Thr	Ser	Lys	Trp	Val	Ala	Asp	Ala	Phe	Gly	Lys	Glu	Gly	Ile	Tyr	Glu
Ala	His	Ile	His	Leu	Asn	Gly	Tyr	Pro	Phe	Leu	Asp	Val	Lys	Asp	Glu

Phe Thr His Arg Thr Leu Ala Thr Asp Val Met Arg Pro Arg Arg Glu
580 585 590
Glu Pro Pro Leu Ser Val Leu Thr Gln Asp Ser Met Thr Val Glu Asp
595 600 605
Val Glu Thr Leu Ile Lys Glu Thr Asp Tyr Asn Gly Phe Pro Val Leu
610 615 620
Val Ser Arg Asp Ser Glu Arg Leu Ile Gly Phe Ala Gln Arg Arg Glu
625 630 635 640
Leu Ile Leu Ala Ile Lys Asn Ala Arg Gln Arg Gln Glu Gly Ile Val
645 650 655
Ser Asn Ser Ile Met Tyr Phe Thr Glu Glu Pro Pro Glu Leu Pro Ala
660 665 670
Asn Ser Pro His Pro Leu Lys Leu Arg Arg Ile Phe Asn Leu Ser Pro
675 680 685
Phe Thr Val Thr Asp His Thr Pro Met Glu Thr Val Val Asp Ile Phe
690 695 700
Arg Lys Leu Gly Leu Arg Gln Cys Leu Val Thr Arg Ser Gly Arg Leu
705 710 715 720
Leu Gly Ile Ile Thr Lys Lys Asp Val Leu Arg His Met Ala Gln Met
725 730 735
Ala Asn Gln Asp Pro Glu Ser Ile Met Phe Asn
740 745

<210> 9
<211> 5541
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (27)..(2636)
<223> CLC-6

<300>
<308> GenBank/X83378 GI:1154676

<300>
<303> FEBS Lett.
<304> 1995
<305> 377 (1)
<306> 15-20
<308> GenBank/267743 GI:1177439

<400> 9
gtccagagtg gcagtaaagg aggaag atg gcg ggg tgc agg ggg tct ctg tgc 53
Met Ala Gly Cys Arg Gly Ser Leu Cys
1 5
tgc tgc tgc agg tgg tgc tgc tgc tgc ggt gag cgt gag acc cgc acc 101
Cys Cys Cys Arg Trp Cys Cys Cys Cys Gly Glu Arg Glu Thr Arg Thr 25
10 15 20
ccc gag gag ctg acc atc ctt gga gaa aca cag gag gag gag gat gag 149
Pro Glu Glu Leu Thr Ile Leu Gly Glu Thr Gln Glu Glu Glu Asp Glu 40
30 35 40
att ctt cca agg aaa gac tat gag agt ttg gat tat gat cgc tgt atc 197
Ile Leu Pro Arg Lys Asp Tyr Glu Ser Leu Asp Tyr Asp Arg Cys Ile 55
45 50 55
aat gac cct tac ctg gaa gtt ttg gag acc atg gat aat aag aaa ggt 245
Asn Asp Pro Tyr Leu Glu Val Leu Glu Thr Met Asp Asn Lys Lys Gly 60 65 70
cga aga tat gag gcg gtg aag tgg atg gtg gtg ttt gcc att gga gtc 293
Arg Arg Tyr Glu Ala Val Lys Trp Met Val Val Phe Ala Ile Gly Val 75 80 85

ttg Cys 90	act Thr	ggc Gly	ctg Leu	gtg Val	ggg Gly 95	ctc Leu	ttt Phe	gtg Val	gac Asp	ttt Phe 100	ttt Phe	gtg Val	cga Arg	ctc Leu	ttc Phe 105	341
acc Thr	caa Gln	ctc Leu	aag Lys	ttc Phe 110	gga Gly	gtg Val	gta Val	cag Gln	aca Thr 115	tcg Ser	gtg Val	gag Glu	gag Glu	tgc Cys 120	agc Ser	389
cag Gln	aaa Lys	ggc Gly	tgc Cys 125	ctc Leu	gct Ala	ctg Leu	tct Ser	ctc Leu 130	ctt Leu	gaa Glu	ctc Leu	ctg Leu	ggg Gly 135	ttt Phe	aac Asn	437
ctc Leu	acc Thr	ttt Phe 140	gtc Val	ttc Phe	ctg Leu	gca Ala	agc Ser 145	ctc Leu	ctt Leu	gtt Val	ctc Leu	att Ile 150	gag Glu	ccg Pro	gtg Val	485
gca Ala 155	gca Ala	ggg Gly	tcc Ser	ggg Gly	ata Ile	ccc Pro 160	gag Glu	gtc Val	aaa Lys	tgc Cys	tat Tyr 165	ctg Leu	aat Asn	ggc Gly	gta Val	533
aag Lys 170	gtg Val	cca Pro	gga Gly	atc Ile	gtc Val 175	cgt Arg	ctc Leu	cgg Arg	acc Thr	ctg Leu 180	ctc Leu	tgc Cys	aag Lys	gtc Val	ctt Leu 185	581
gga Gly	gtg Val	ctg Leu	ttc Phe	agt Ser 190	gtg Val	gct Ala	gga Gly	ggg Gly	ctc Leu 195	ttc Phe	gtg Val	ggg Gly	aag Lys	gaa Glu 200	ggc Gly	629
ccc Pro	atg Met	atc Ile	cac His 205	agt Ser	ggg Gly	tgc Ser	gtg Val	gtg Val 210	gga Gly	gct Ala	ggc Gly	ctc Leu	cct Pro 215	cag Gln	ttt Phe	677
cag Gln	agc Ser	atc Ile 220	tcc Ser	tta Leu	cgg Arg	aag Lys	atc Ile 225	cag Gln	ttt Phe	aac Asn	ttc Phe	ccc Pro 230	tat Tyr	ttc Phe	cga Arg	725
agc Ser	gac Asp 235	aga Arg	gac Asp	aag Lys	aga Arg	gac Asp 240	ttt Phe	gta Val	tca Ser	gca Ala	gga Gly 245	gcg Ala	gct Ala	gct Ala	gga Gly	773
gtt Val 250	gct Ala	gca Ala	gct Ala	ttc Phe	ggg Gly 255	gcg Ala	cca Pro	atc Ile	ggg Gly	ggg Gly 260	acc Thr	ttg Leu	ttc Phe	agt Ser	cta Leu 265	821
gag Glu	gag Glu	ggg Gly	tgc Ser	tcc Ser 270	ttc Phe	tgg Trp	aac Asn	caa Gln	ggg Gly 275	ctc Leu	acg Thr	tgg Trp	aaa Lys	gtg Val 280	ctc Leu	869
ttt Phe	tgt Cys	tcc Ser	atg Met 285	tct Ser	gcc Ala	acc Thr	ttc Phe	acc Thr 290	ctc Leu	aac Asn	ttc Phe	ttc Phe	cgt Arg 295	tct Ser	ggg Gly	917
att Ile	cag Gln	ttt Phe 300	gga Gly	agc Ser	tgg Trp	ggg Gly	tcc Ser 305	ttc Phe	cag Gln	ctc Leu	cct Pro	gga Gly 310	ttg Leu	ctg Leu	aac Asn	965
ttt Phe 315	ggc Gly	gag Glu	ttt Phe	aag Lys	tgc Cys	tct Ser 320	gac Asp	tct Ser	gat Asp	aaa Lys	aaa Lys 325	tgt Cys	cat His	ctc Leu	tgg Trp	1013
aca Thr 330	gct Ala	atg Met	gat Asp	ttg Leu	ggg Gly 335	ttc Phe	ttc Phe	gtc Val	gtg Val	atg Met 340	ggg Gly	gtc Val	att Ile	ggg Gly	ggc Gly 345	1061
ctc Leu	ctg Leu	gga Gly	gcc Ala	aca Thr 350	ttc Phe	aac Asn	tgt Cys	ctg Leu	aac Asn 355	aag Lys	agg Arg	ctt Leu	gca Ala	aag Lys 360	tac Tyr	1109
cgt	atg	cga	aac	gtg	cac	ccg	aaa	cct	aag	ctc	gtc	aga	gtc	tta	gag	1157

Arg	Met	Arg	Asn	Val	His	Pro	Lys	Pro	Lys	Leu	Val	Arg	Val	Leu	Glu	
			365					370					375			
agc	ctc	ctt	gtg	tct	ctg	gta	acc	acc	gtg	gtg	gtg	ttt	gtg	gcc	tcg	1205
Ser	Leu	Leu	Val	Ser	Leu	Val	Thr	Thr	Val	Val	Val	Phe	Val	Ala	Ser	
		380					385					390				
atg	gtg	tta	gga	gaa	tgc	cga	cag	atg	tcc	tct	tcg	agt	caa	atc	ggc	1253
Met	Val	Leu	Gly	Glu	Cys	Arg	Gln	Met	Ser	Ser	Ser	Ser	Gln	Ile	Gly	
	395					400					405					
aat	gac	tca	ttc	cag	ctc	cag	gtc	aca	gaa	gat	gtg	aat	tca	agt	atc	1301
Asn	Asp	Ser	Phe	Gln	Cys	Gln	Val	Thr	Glu	Asp	Val	Asn	Ser	Ser	Ile	
410					415				420						425	
aag	aca	ttt	ttt	tgt	ccc	aat	gat	acc	tac	aat	gac	atg	gcc	aca	ctc	1349
Lys	Thr	Phe	Phe	Cys	Pro	Asn	Asp	Thr	Tyr	Asn	Asp	Met	Ala	Thr	Leu	
				430					435					440		
ttc	ttc	aac	ccg	cag	gag	tct	gcc	atc	ctc	cag	ctc	ttc	cac	cag	gat	1397
Phe	Phe	Asn	Pro	Gln	Glu	Ser	Ala	Ile	Leu	Gln	Leu	Phe	His	Gln	Asp	
			445					450					455			
ggc	act	ttc	agc	ccc	gtc	act	ctg	gcc	ttg	ttc	ttc	gtt	ctc	tat	ttc	1445
Gly	Thr	Phe	Ser	Pro	Val	Thr	Leu	Ala	Leu	Phe	Phe	Val	Leu	Tyr	Phe	
		460					465					470				
ttg	ctt	gca	tgt	tgg	act	tac	ggc	att	tct	gtt	cca	agt	ggc	ctt	ttt	1493
Leu	Leu	Ala	Cys	Trp	Thr	Tyr	Gly	Ile	Ser	Val	Pro	Ser	Gly	Leu	Phe	
	475					480					485					
gtg	cct	tct	ctg	ctg	tgt	gga	gct	gct	ttt	gga	cgt	tta	gtt	gcc	aat	1541
Val	Pro	Ser	Leu	Leu	Cys	Gly	Ala	Ala	Phe	Gly	Arg	Leu	Val	Ala	Asn	
490					495					500					505	
gtc	cta	aaa	agc	tac	att	gga	ttg	ggc	cac	atc	tat	tcg	ggg	acc	ttt	1589
Val	Leu	Lys	Ser	Tyr	Ile	Gly	Leu	Gly	His	Ile	Tyr	Ser	Gly	Thr	Phe	
				510					515					520		
gcc	ctg	att	ggc	gca	gcg	gct	ttc	ttg	ggc	ggg	gtg	gtc	cgc	atg	acc	1637
Ala	Leu	Ile	Gly	Ala	Ala	Ala	Phe	Leu	Gly	Gly	Val	Val	Arg	Met	Thr	
			525					530					535			
atc	agc	ctc	acg	gtc	atc	ctg	atc	gag	tcc	acc	aat	gag	atc	acc	tac	1685
Ile	Ser	Leu	Thr	Val	Ile	Leu	Ile	Glu	Ser	Thr	Asn	Glu	Ile	Thr	Tyr	
		540					545					550				
ggg	ctc	ccc	atc	atg	gtc	aca	ctg	atg	gtg	gcc	aaa	tgg	aca	ggg	gac	1733
Gly	Leu	Pro	Ile	Met	Val	Thr	Leu	Met	Val	Ala	Lys	Trp	Thr	Gly	Asp	
	555					560					565					
ttt	ttc	aat	aag	ggc	att	tat	gat	atc	cac	gtg	ggc	ctg	cga	ggc	gtg	1781
Phe	Phe	Asn	Lys	Gly	Ile	Tyr	Asp	Ile	His	Val	Gly	Leu	Arg	Gly	Val	
570					575					580					585	
ccg	ctt	ctg	gaa	tgg	gag	aca	gag	gtg	gaa	atg	gac	aag	ctg	aga	gcc	1829
Pro	Leu	Leu	Glu	Trp	Glu	Thr	Glu	Val	Glu	Met	Asp	Lys	Leu	Arg	Ala	
				590					595					600		
agc	gac	atc	atg	gag	ccc	aac	ctg	acc	tac	gtc	tac	ccg	cac	acc	cgc	1877
Ser	Asp	Ile	Met	Glu	Pro	Asn	Leu	Thr	Tyr	Val	Tyr	Pro	His	Thr	Arg	
			605					610					615			
atc	cag	tct	ctg	gtg	agc	atc	ctg	cgc	acc	acg	gtc	cac	cat	gcc	ttc	1925
Ile	Gln	Ser	Leu	Val	Ser	Ile	Leu	Arg	Thr	Thr	Val	His	His	Ala	Phe	
		620					625					630				
ccg	gtg	gtc	aca	gag	aac	cgc	ggt	aac	gag	aag	gag	ttc	atg	aag	ggc	1973

[illegible]

gggccccggg ctgcactccg agcagtgttc ctggccatct ttgctacttt cctagagaac 3006
ccggctgttg ccttaaagt gtgagaggga cttggccaag gcaaaagctg gggagatgcc 3066
agtgacaaca tacagttcat gactaggttt aggaattggg cactgagaaa attctcaata 3126
tttcagagag tccttccctt atttgggact cctaacacgg tatcctcgct agtttgtttt 3186
aagggaaca ctctgtcctt ggggtgtgagc agaggctctg gtcttgccct gtggtttgac 3246
tctccttaga accaccgccc accagaaaca taaaggatta aaatcacact aataaccctt 3306
ggatgggtcaa tctgataata ggatcagatt tacgtctacc ctaattctta acattgcagc 3366
tttctctcca tctgcagatt attcccagtc tcccagtaac acgtttctac ccagatcctt 3426
tttcatttcc ttaagttttg atctccgtct tctgatgaa gcaggcagag ctcagaggat 3486
cttggcatca cccaccaaag ttagctgaaa gcagggcact cctggataaa gcagcttcac 3546
tcaactctgg ggaatgtac catTTTTTTT ccaaagtaga aaggaagcac ttctgagcca 3606
gtgaccactg aaaggtatgt gctatgataa agcagatggc ctatttgagg aagagggtgt 3666
ctgcccttca caaacacctc tctctccctt gcactagctg tcccaagctt acatacagag 3726
gcccttcagg agggcctcct gtgccgcagg gaggggtcgt ggggaagatg cttcctgcca 3786
gcacgtgcct gaaggtttca catgaagcat gggaagcgca ccctgtcgtt cagtgcagtc 3846
attcttctcc aggttggccc gccccctctg actaggcacc caaagtgagc atctgggcat 3906
tgggcattca tgcttatctt cccccacctt ctacatggta tcagtcccag caggcatccc 3966
tggggcagac gtgctttggc tcaagatggc cttcatttac gtttagtttt ttttaaaacc 4026
gtggagggtg cccacgggcc tcggcacctg gccctggcag cacagctctc aggcccagcc 4086
ctgggcgacc tccttggcca agtctgcctt tcaccctggg gtgagcatca gtcctggctc 4146
tgctgggtcca gatcttgcgc tcagcacact ctagggaata attccactcc agagatgggg 4206
ctgcttcaag gtcttttcta gctgattgtg gccccctcat tttccccatt ttcttatctc 4266
cctgaccaa attgctttga cttctaaatg tttctgcttc ccagaatgca cctgacttat 4326
gaaatgggga taatactccc aggaaatagc gcaggacatc acaaggacca aaaaggcaat 4386
tcttatttaa atgttactat ttggccagct gctgctgtgt tttatggcag tgttcagagc 4446
ttgatcacgt tatttcttcc ttttattaag aaggaagcca attgtccaag tcaggagaat 4506
gggtgtgatca cctgtcacag aactttgtc ccctctcccc gcccttctt ggagctggca 4566
gagctaacgc cctgcaggag gaccccgcc tctcgagggc tggatcagca gccgcctgcc 4626
ctgaggctgc cccggtgaat gttattggaa ttcacccctc gtgcacatcc tgttggtgtt 4686
aagtcaccag atattttgtt cccatcagtt tagcccagag atagacagta gaatgcaaat 4746
acctccctcc cctaaactga ctggacggct gccaaaggagg ccccaaacc aggccccatg 4806
caaaggcacg tggtttcctt ttctcctctc tctgcatctg cgctttccag ataagcccaa 4866
agacagcaac ttctccactc atgacaaatc aactgtgacc ctcgctcctt ccatttctgt 4926
ccattagaaa ccagcctttt cagcatctca cccattagca gccccatcac ccagtgatca 4986
gtgcctcag taaagcagat ctgtggatgg ggagcctacg ggtggtgtaaga agtggtgttt 5046

tgtgtttcat ctccagcttg gtgttccatg gcccttaggc gaggtgatca gggagtgggg 5106
 ccaatgggcc cccggccctg gctttgggac cttgtgctga gggatgattt gctcctgacc 5166
 ttgattaact taacagttcc cagctggaag ggacactttc aggacccagt ccactgtatg 5226
 gcatttgtga tgcagaatta tgcactgaca tgaccctggg tgacaggaaa gcctttcgag 5286
 aggcccaagg tggcctcgcc agccctgcag tattgatgtg cagtattgca ccacagctct 5346
 gcggaccttg gccattgccg cagtcgcagc ttcctttttt ctgtttgcac tgtttgtttg 5406
 tatgatgtta gctaattcca ctgtgtatat aaattgtatt ttttttaatt tgtaaaatgc 5466
 tattttttatt tgaacctttg gaacttgga gttctcattg taaccctaac atgtgagaat 5526
 aaaatgtctt ctgtc 5541

<210> 10
 <211> 869
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 10
 Met Ala Gly Cys Arg Gly Ser Leu Cys Cys Cys Cys Arg Trp Cys Cys
 1 5 10 15
 Cys Cys Gly Glu Arg Glu Thr Arg Thr Pro Glu Glu Leu Thr Ile Leu
 20 25 30
 Gly Glu Thr Gln Glu Glu Glu Asp Glu Ile Leu Pro Arg Lys Asp Tyr
 35 40 45
 Glu Ser Leu Asp Tyr Asp Arg Cys Ile Asn Asp Pro Tyr Leu Glu Val
 50 55 60
 Leu Glu Thr Met Asp Asn Lys Lys Gly Arg Arg Tyr Glu Ala Val Lys
 65 70 75 80
 Trp Met Val Val Phe Ala Ile Gly Val Cys Thr Gly Leu Val Gly Leu
 85 90 95
 Phe Val Asp Phe Phe Val Arg Leu Phe Thr Gln Leu Lys Phe Gly Val
 100 105 110
 Val Gln Thr Ser Val Glu Glu Cys Ser Gln Lys Gly Cys Leu Ala Leu
 115 120 125
 Ser Leu Leu Glu Leu Leu Gly Phe Asn Leu Thr Phe Val Phe Leu Ala
 130 135 140
 Ser Leu Leu Val Leu Ile Glu Pro Val Ala Ala Gly Ser Gly Ile Pro
 145 150 155 160
 Glu Val Lys Cys Tyr Leu Asn Gly Val Lys Val Pro Gly Ile Val Arg
 165 170 175
 Leu Arg Thr Leu Leu Cys Lys Val Leu Gly Val Leu Phe Ser Val Ala
 180 185 190
 Gly Gly Leu Phe Val Gly Lys Glu Gly Pro Met Ile His Ser Gly Ser
 195 200 205
 Val Val Gly Ala Gly Leu Pro Gln Phe Gln Ser Ile Ser Leu Arg Lys
 210 215 220
 Ile Gln Phe Asn Phe Pro Tyr Phe Arg Ser Asp Arg Asp Lys Arg Asp
 225 230 235 240
 Phe Val Ser Ala Gly Ala Ala Ala Gly Val Ala Ala Phe Gly Ala
 245 250 255
 Pro Ile Gly Gly Thr Leu Phe Ser Leu Glu Glu Gly Ser Ser Phe Trp
 260 265 270
 Asn Gln Gly Leu Thr Trp Lys Val Leu Phe Cys Ser Met Ser Ala Thr
 275 280 285
 Phe Thr Leu Asn Phe Phe Arg Ser Gly Ile Gln Phe Gly Ser Trp Gly
 290 295 300
 Ser Phe Gln Leu Pro Gly Leu Leu Asn Phe Gly Glu Phe Lys Cys Ser
 305 310 315 320
 Asp Ser Asp Lys Lys Cys His Leu Trp Thr Ala Met Asp Leu Gly Phe
 325 330 335
 Phe Val Val Met Gly Val Ile Gly Gly Leu Leu Gly Ala Thr Phe Asn
 340 345 350

Cys	Leu	Asn	Lys	Arg	Leu	Ala	Lys	Tyr	Arg	Met	Arg	Asn	Val	His	Pro
		355					360					365			
Lys	Pro	Lys	Leu	Val	Arg	Val	Leu	Glu	Ser	Leu	Leu	Val	Ser	Leu	Val
		370				375					380				
Thr	Thr	Val	Val	Val	Phe	Val	Ala	Ser	Met	Val	Leu	Gly	Glu	Cys	Arg
385					390					395				400	
Gln	Met	Ser	Ser	Ser	Ser	Gln	Ile	Gly	Asn	Asp	Ser	Phe	Gln	Leu	Gln
				405					410					415	
Val	Thr	Glu	Asp	Val	Asn	Ser	Ser	Ile	Lys	Thr	Phe	Phe	Cys	Pro	Asn
			420					425					430		
Asp	Thr	Tyr	Asn	Asp	Met	Ala	Thr	Leu	Phe	Phe	Asn	Pro	Gln	Glu	Ser
		435					440					445			
Ala	Ile	Leu	Gln	Leu	Phe	His	Gln	Asp	Gly	Thr	Phe	Ser	Pro	Val	Thr
	450					455					460				
Leu	Ala	Leu	Phe	Phe	Val	Leu	Tyr	Phe	Leu	Leu	Ala	Cys	Trp	Thr	Tyr
465					470					475					480
Gly	Ile	Ser	Val	Pro	Ser	Gly	Leu	Phe	Val	Pro	Ser	Leu	Leu	Cys	Gly
				485					490					495	
Ala	Ala	Phe	Gly	Arg	Leu	Val	Ala	Asn	Val	Leu	Lys	Ser	Tyr	Ile	Gly
			500					505					510		
Leu	Gly	His	Ile	Tyr	Ser	Gly	Thr	Phe	Ala	Leu	Ile	Gly	Ala	Ala	Ala
		515					520					525			
Phe	Leu	Gly	Gly	Val	Val	Arg	Met	Thr	Ile	Ser	Leu	Thr	Val	Ile	Leu
	530					535					540				
Ile	Glu	Ser	Thr	Asn	Glu	Ile	Thr	Tyr	Gly	Leu	Pro	Ile	Met	Val	Thr
545					550					555					560
Leu	Met	Val	Ala	Lys	Trp	Thr	Gly	Asp	Phe	Phe	Asn	Lys	Gly	Ile	Tyr
				565					570					575	
Asp	Ile	His	Val	Gly	Leu	Arg	Gly	Val	Pro	Leu	Leu	Glu	Trp	Glu	Thr
			580					585					590		
Glu	Val	Glu	Met	Asp	Lys	Leu	Arg	Ala	Ser	Asp	Ile	Met	Glu	Pro	Asn
		595					600					605			
Leu	Thr	Tyr	Val	Tyr	Pro	His	Thr	Arg	Ile	Gln	Ser	Leu	Val	Ser	Ile
	610					615					620				
Leu	Arg	Thr	Thr	Val	His	His	Ala	Phe	Pro	Val	Val	Thr	Glu	Asn	Arg
625					630					635					640
Gly	Asn	Glu	Lys	Glu	Phe	Met	Lys	Gly	Asn	Gln	Leu	Ile	Ser	Asn	Asn
				645					650					655	
Ile	Lys	Phe	Lys	Lys	Ser	Ser	Ile	Leu	Thr	Arg	Ala	Gly	Glu	Gln	Arg
			660					665					670		
Lys	Arg	Ser	Gln	Ser	Met	Lys	Ser	Tyr	Pro	Ser	Ser	Glu	Leu	Arg	Asn
		675					680					685			
Met	Cys	Asp	Glu	His	Ile	Ala	Ser	Glu	Glu	Pro	Ala	Glu	Lys	Glu	Asp
	690					695					700				
Leu	Leu	Gln	Gln												

<210> 11
<211> 2750
<212> DNA
<213> Rattus norvegicus

<220>
<221> CDS
<222> (69)..(2480)
<223> C1C-7

<300>
<308> GenBank/Z67744 GI:1177612

<400> 11
ggggcgcggg tcacgggaac gctgccgggc tgccggctgt tcttgtggag tttggtcctc 60
agtgggcc atg gcc aac gtt tct aag aaa gtg tct tgg tcc ggc cga gat 110
Met Ala Asn Val Ser Lys Lys Val Ser Trp Ser Gly Arg Asp
1 5 10
cgc gat gac gag gag ggg gcg ccg ctg ctt cga agg acg ggg caa cct 158
Arg Asp Asp Glu Glu Gly Ala Pro Leu Leu Arg Arg Thr Gly Gln Pro 30
15 20 25 30
gac gag gag acg ccg ctg ctg aac gga gcc ggg ccg ggc gcg cgc cag 206
Asp Glu Glu Thr Pro Leu Leu Asn Gly Ala Gly Pro Gly Ala Arg Gln 45
35 40 45
tct cat tct gca ctt ttc cga att gga cag atg aac aac gtg gag ctg 254
Ser His Ser Ala Leu Phe Arg Ile Gly Gln Met Asn Asn Val Glu Leu 60
50 55 60
gat gat gaa ctc ctg gac ccg gaa gtg gac cct cct cac acc ttc ccc 302
Asp Asp Glu Leu Leu Asp Pro Glu Val Asp Pro Pro His Thr Phe Pro 75
65 70 75
aag gag att cca cac aac gag aag ctc ctc tcc ctc aag tat gag agc 350
Lys Glu Ile Pro His Asn Glu Lys Leu Leu Ser Leu Lys Tyr Glu Ser 90
80 85 90
ctg gac tat gac aat agt gag aat cag ctc ttc ctg gag gag gaa aga 398
Leu Asp Tyr Asp Asn Ser Glu Asn Gln Leu Phe Leu Glu Glu Glu Arg 110
95 100 105 110
cga atc aac cac acg gct ttc ccg aca gtg gag atc aag cgc tgg gtt 446
Arg Ile Asn His Thr Ala Phe Arg Thr Val Glu Ile Lys Arg Trp Val 125
115 120 125
atc tgt gcc ctc att gga atc ctc aca ggc cta gta gcc tgc ttc att 494
Ile Cys Ala Leu Ile Gly Ile Leu Thr Gly Leu Val Ala Cys Phe Ile 140
130 135 140
gac att gta gtg gag aac ctg gca ggc ctc aag tac cga gtc atc aag 542
Asp Ile Val Val Glu Asn Leu Ala Gly Leu Lys Tyr Arg Val Ile Lys 155
145 150 155
gac aac atc gac aag ttc aca gag aag ggc ggc ctg tcc ttc tcc ctc 590
Asp Asn Ile Asp Lys Phe Thr Glu Lys Gly Gly Leu Ser Phe Ser Leu 170
160 165 170
ctg ctg tgg gcc aca ctg aac tct gcc ttc gtg ctc gtg ggg tct gtg 638
Leu Leu Trp Ala Thr Leu Asn Ser Ala Phe Val Leu Val Gly Ser Val 190
175 180 185 190
att gtg gcc ttc ata gag cca gtt gct gct ggc agc gga atc cct cag 686
Ile Val Ala Phe Ile Glu Pro Val Ala Ala Gly Ser Gly Ile Pro Gln 205
195 200 205
atc aag tgc ttc ctc aat ggg gtg aag atc ccc cac gtg gtg cgg ctc 734

Ile	Lys	Cys	Phe	Leu	Asn	Gly	Val	Lys	Ile	Pro	His	Val	Val	Arg	Leu	
			210					215					220			
aag	acg	ctg	gtg	atc	aag	gtg	tct	ggc	gtg	att	ctg	tct	gtg	gta	ggg	782
Lys	Thr	Leu	Val	Ile	Lys	Val	Ser	Gly	Val	Ile	Leu	Ser	Val	Val	Gly	
		225					230					235				
gga	ctg	gct	gtg	gga	aag	gaa	ggg	cca	atg	atc	cac	tca	gga	tcc	gtg	830
Gly	Leu	Ala	Val	Gly	Lys	Glu	Gly	Pro	Met	Ile	His	Ser	Gly	Ser	Val	
		240				245					250					
att	gct	gca	ggg	att	tca	cag	gga	agg	tcg	acg	tca	ctc	aag	cga	gat	878
Ile	Ala	Ala	Gly	Ile		Gln	Gly	Arg	Ser	Thr	Ser	Leu	Lys	Arg	Asp	
255					260					265					270	
ttt	aag	atc	ttt	gaa	tat	ttc	cgc	aga	gat	aca	gag	aag	cgg	gat	ttt	926
Phe	Lys	Ile	Phe		Tyr	Phe	Arg	Arg	Asp	Thr	Glu	Lys	Arg	Asp	Phe	
				275					280					285		
gtc	tca	gct	gga	gct	gca	gct	gga	gtg	tct	gct	gcg	ttt	gga	gca	cct	974
Val	Ser	Ala	Gly	Ala	Ala	Ala	Gly	Val	Ser	Ala	Ala	Phe	Gly	Ala	Pro	
			290					295					300			
gtg	ggg	ggg	gtc	ctg	ttc	agc	ctg	gaa	gag	ggc	gcc	tcc	ttc	tggt	aat	1022
Val	Gly	Gly	Val	Leu	Phe	Ser	Leu	Glu	Glu	Gly	Ala	Ser	Phe	Trp	Asn	
		305					310					315				
cag	ttc	ctg	aca	tgg	aga	att	ttc	ttt	gct	tcc	atg	att	tcg	acc	ttt	1070
Gln	Phe	Leu	Thr	Trp	Arg	Ile	Phe	Phe	Ala	Ser	Met	Ile	Ser	Thr	Phe	
		320				325					330					
aca	ctg	aat	ttt	gtt	ctg	agc	atc	tac	cat	gga	aac	atg	tgg	gac	ctg	1118
Thr	Leu	Asn	Phe	Val	Leu	Ser	Ile	Tyr	His	Gly	Asn	Met	Trp	Asp	Leu	
335					340					345					350	
tcc	agc	cct	ggc	ctc	ata	aat	ttt	gga	aga	ttc	gac	tca	gag	aaa	atg	1166
Ser	Ser	Pro	Gly	Leu	Ile	Asn	Phe	Gly	Arg	Phe	Asp	Ser	Glu	Lys	Met	
				355					360					365		
gcc	tac	aca	atc	cat	gag	att	cct	gtc	ttc	atc	gcc	atg	ggg	gtg	gtg	1214
Ala	Tyr	Thr	Ile	His	Glu	Ile	Pro	Val	Phe	Ile	Ala	Met	Gly	Val	Val	
			370					375					380			
ggg	ggc	att	ctt	gga	gcc	gtg	ttc	aat	gcc	ttg	aat	tac	tgg	cta	act	1262
Gly	Gly	Ile	Leu	Gly	Ala	Val	Phe	Asn	Ala	Leu	Asn	Tyr	Trp	Leu	Thr	
		385					390					395				
atg	ttt	cga	atc	agg	tac	atc	cac	cgg	ccc	tgc	ctc	caa	gtg	att	gag	1310
Met	Phe	Arg	Ile	Arg	Tyr	Ile	His	Arg	Pro	Cys	Leu	Gln	Val	Ile	Glu	
		400				405					410					
gcc	atg	ctg	gtg	gca	gct	gtc	aca	gcc	aca	gtt	gca	ttt	gtc	ttg	att	1358
Ala	Met	Leu	Val	Ala	Ala	Val	Thr	Ala	Thr	Val	Ala	Phe	Val	Leu	Ile	
415					420					425					430	
tac	tcg	tct	cga	gat	tgc	cag	ccc	ctg	cag	ggg	agc	tcc	atg	tcc	tac	1406
Tyr	Ser	Ser	Arg	Asp	Cys	Gln	Pro	Leu	Gln	Gly	Ser	Ser	Met	Ser	Tyr	
				435				440						445		
cca	ctc	cag	ctc	ttc	tgt	gca	gat	ggc	gaa	tac	aac	tca	atg	gcc	gca	1454
Pro	Leu	Gln	Leu	Phe	Cys	Ala	Asp	Gly	Glu	Tyr	Asn	Ser	Met	Ala	Ala	
			450					455					460			
gcc	ttc	ttt	aac	acc	cct	gag	aag	agc	gtc	gtc	agc	ctg	ttc	cac	gac	1502
Ala	Phe	Phe	Asn	Thr	Pro	Glu	Lys	Ser	Val	Val	Ser	Leu	Phe	His	Asp	
		465					470					475				
cca	cca	ggc	tcc	tat	aat	ccc	atg	act	ctc	ggc	ctg	ttc	acc	ctg	gtc	1550

Pro 480	Pro 480	Gly	Ser	Tyr	Asn 485	Pro 485	Met	Thr	Leu	Gly	Leu 490	Phe	Thr	Leu	Val		
tac Tyr 495	ttc Phe	ttc Phe	ctg Leu	gcc Ala	tgc Cys 500	tgg Trp	acc Thr	tat Tyr	ggc Gly	ctc Leu 505	aca Thr	gta Val	tct Ser	gct Ala	ggg Gly 510	1598	
gtc Val	ttc Phe	atc Ile	cca Pro	tcc Ser 515	ctg Leu	ctc Leu	att Ile	ggg Gly	gct Ala 520	gcc Ala	tgg Trp	ggc Gly	cga Arg	ctc Leu 525	ttt Phe	1646	
ggc Gly	atc Ile	tcc Ser	atg Met 530	tcc Ser	tac Tyr	ctc Leu	aca Thr	gga Gly 535	gca Ala	gcg Ala	atc Ile	tgg Trp	gca Ala 540	gat Asp	ccg Pro	1694	
ggg Gly	aaa Lys	tac Tyr 545	gcc Ala	ctg Leu	atg Met	gga Gly	gct Ala 550	gct Ala	gct Ala	cag Gln	ctt Leu	ggg Gly 555	ggg Gly	atc Ile	gtg Val	1742	
agg Arg	atg Met 560	acc Thr	ctt Leu	agc Ser	ctg Leu	aca Thr 565	gtc Val	atc Ile	atg Met	atg Met	gag Glu 570	gcc Ala	acc Thr	agc Ser	aac Asn	1790	
gtg Val 575	acc Thr	tac Tyr	ggg Gly	ttt Phe	ccc Pro 580	atc Ile	atg Met	ttg Leu	gtg Val	ctg Leu 585	atg Met	act Thr	gcc Ala	aag Lys	att Ile 590	1838	
gtg Val	ggg Gly	gat Asp	gtc Val	ttc Phe 595	att Ile	gag Glu	ggc Gly	ctc Leu	tat Tyr 600	gac Asp	atg Met	cac His	atc Ile	cag Gln 605	ctg Leu	1886	
caa Gln	agt Ser	gtg Val	ccc Pro 610	ttc Phe	cta Leu	cac His	tgg Trp	gaa Glu 615	gcc Ala	ccg Pro	gtc Val	acc Thr	tca Ser 620	cat His	tcg Ser	1934	
ctc Leu	act Thr	gcc Ala 625	agg Arg	gaa Glu	gta Val	atg Met	agc Ser	acg Thr	cct Pro	gtg Val	acc Thr	tgc Cys 635	ctg Leu	agg Arg	agg Arg	1982	
aga Arg	gag Glu 640	aag Lys	gtt Val	ggc Gly	atc Ile	atc Ile 645	gtg Val	gat Asp	gtc Val	cta Leu	agt Ser 650	gac Asp	aca Thr	gcg Ala	tct Ser	2030	
aat Asn 655	cac His	aat Asn	ggg Gly	ttc Phe	cct Pro 660	gtg Val	gtg Val	gag Glu	gat Asp	gta Val 665	gga Gly	gac Asp	acc Thr	cag Gln	cca Pro 670	2078	
gcc Ala	aga Arg	ctc Leu	caa Gln	ggc Gly 675	cta Leu	atc Ile	ctg Leu	cgt Arg	tcc Ser 680	cag Gln	ctc Leu	atc Ile	gtg Val	ctc Leu 685	ctg Leu	2126	
aag Lys	cac His	aag Lys	gtg Val 690	ttt Phe	gtg Val	gag Glu	agg Arg	tcc Ser 695	aac Asn	atg Met	ggg Gly	ttg Leu	gtg Val 700	cag Gln	cgg Arg	2174	
aga Arg	ctg Leu	agg Arg 705	ctg Leu	aaa Lys	gac Asp	ttt Phe	cgc Arg	gat Asp 710	gcc Ala	tac Tyr	cca Pro	cgc Arg 715	ttc Phe	ccc Pro	cca Pro	2222	
atc Ile 720	cag Gln	tcc Ser	atc Ile	cac His	gta Val	tcc Ser 725	cag Gln	gat Asp	gag Glu	cgg Arg	gag Glu 730	tgc Cys	acc Thr	atg Met	gac Asp	2270	
ctt Leu 735	tct Ser	gag Glu	ttc Phe	atg Met	aac Asn 740	cct Pro	tct Ser	ccc Pro	tac Tyr	act Thr 745	gtg Val	cca Pro	cag Gln	gag Glu	gca Ala 750	2318	
tct Val	ctt Val	cct Val	cga Val	gtg Val	ttc Val	aag Val	ctg Val	ttc Val	cgg Val	gct Val	ctg Val	ggc Val	ctg Val	agg Val	cac Val	2366	

Ser Leu Pro Arg Val Phe Lys Leu Phe Arg Ala Leu Gly Leu Arg His
755 760 765
ctg gtc gta gta gac aac cac aat cag gtg gtc ggg ctg gtg acc agg 2414
Leu Val Val Val Asp Asn His Asn Gln Val Val Gly Leu Val Thr Arg
770 775 780
aag gac cta gca aga tac cgc cta gga aaa gga ggc cta gaa gag ctt 2462
Lys Asp Leu Ala Arg Tyr Arg Leu Gly Lys Gly Gly Leu Glu Glu Leu
785 790 795
tca ctg gcc cag acg tga gggctggccc ccacccttgg gcagcggcac 2510
Ser Leu Ala Gln Thr
800

ccccgccct ctgcacctcc tcccagggtc cctggtctca gccaaagcct tgccctgggc 2570
agtgcagcaa caggagcaaaa tgccctcccc gggcttggct ggtgtggggc ccagaccctt 2630
tgtcctgggc agttgggttta catcatcagc atttccctat tccctgaacc tgcagtcctc 2690
agacttgtcc cactcctggg tcccttctcc caggatgtaa agtgtgtttt cacaccctt 2750

<210> 12
<211> 803
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 12
Met Ala Asn Val Ser Lys Lys Val Ser Trp Ser Gly Arg Asp Arg Asp
1 5 10 15
Asp Glu Glu Gly Ala Pro Leu Leu Arg Arg Thr Gly Gln Pro Asp Glu
20 25 30
Glu Thr Pro Leu Leu Asn Gly Ala Gly Pro Gly Ala Arg Gln Ser His
35 40 45
Ser Ala Leu Phe Arg Ile Gly Gln Met Asn Asn Val Glu Leu Asp Asp
50 55 60
Glu Leu Leu Asp Pro Glu Val Asp Pro Pro His Thr Phe Pro Lys Glu
65 70 75 80
Ile Pro His Asn Glu Lys Leu Leu Ser Leu Lys Tyr Glu Ser Leu Asp
85 90 95
Tyr Asp Asn Ser Glu Asn Gln Leu Phe Leu Glu Glu Glu Arg Arg Ile
100 105 110
Asn His Thr Ala Phe Arg Thr Val Glu Ile Lys Arg Trp Val Ile Cys
115 120 125
Ala Leu Ile Gly Ile Leu Thr Gly Leu Val Ala Cys Phe Ile Asp Ile
130 135 140
Val Val Glu Asn Leu Ala Gly Leu Lys Tyr Arg Val Ile Lys Asp Asn
145 150 155 160
Ile Asp Lys Phe Thr Glu Lys Gly Gly Leu Ser Phe Ser Leu Leu Leu
165 170 175
Trp Ala Thr Leu Asn Ser Ala Phe Val Leu Val Gly Ser Val Ile Val
180 185 190
Ala Phe Ile Glu Pro Val Ala Ala Gly Ser Gly Ile Pro Gln Ile Lys
195 200 205
Cys Phe Leu Asn Gly Val Lys Ile Pro His Val Val Arg Leu Lys Thr
210 215 220
Leu Val Ile Lys Val Ser Gly Val Ile Leu Ser Val Val Gly Gly Leu
225 230 235 240
Ala Val Gly Lys Glu Gly Pro Met Ile His Ser Gly Ser Val Ile Ala
245 250 255
Ala Gly Ile Ser Gln Gly Arg Ser Thr Ser Leu Lys Arg Asp Phe Lys
260 265 270
Ile Phe Glu Tyr Phe Arg Arg Asp Thr Glu Lys Arg Asp Phe Val Ser
275 280 285
Ala Gly Ala Ala Ala Gly Val Ser Ala Ala Phe Gly Ala Pro Val Gly
290 295 300

[illegible]

<210> 13
<211> 2393
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(2370)
<223> ClC-7

<300>
<303> FEBS Lett.
<304> 1995
<305> 377 (1)
<306> 15-20
<308> GenBank/Z67743 GI:1177439

<400> 13
gac gag gag gcg gcg ccg ctg ctg cgg agg acg gcg cgg ccc ggc ggg 48
Asp Glu Glu Ala Ala Pro Leu Leu Arg Arg Thr Ala Arg Pro Gly Gly
1 5 10 15
ggg acg ccg ctg ctg aac ggg gct ggg ccc ggg gct gcg cgc cag tca 96
Gly Thr Pro Leu Leu Asn Gly Ala Gly Pro Gly Ala Ala Arg Gln Ser
20 25 30
cca cgt tct gcg ctt ttc cga gtc gga cat atg agc agc gtg gag ctg 144
Pro Arg Ser Ala Leu Phe Arg Val Gly His Met Ser Ser Val Glu Leu
35 40 45
gat gat gaa ctt ttg gac ccg gat atg gac cct cca cat ccc ttc ccc 192
Asp Asp Glu Leu Leu Asp Pro Asp Met Asp Pro Pro His Pro Phe Pro
50 55 60
aag gag atc cca cac aac gag aag ctc ctg tcc ctc aag tat gag agc 240
Lys Glu Ile Pro His Asn Glu Lys Leu Leu Ser Leu Lys Tyr Glu Ser
65 70 75 80
ttg gac tat gac aac agt gag aac cag ctg ttc ctg gag gag gag cgg 288
Leu Asp Tyr Asp Asn Ser Glu Asn Gln Leu Phe Leu Glu Glu Glu Arg
85 90 95
cgg atc aat cac acg gcc ttc cgg acg gtg gag atc aag cgc tgg gtc 336
Arg Ile Asn His Thr Ala Phe Arg Thr Val Glu Ile Lys Arg Trp Val
100 105 110
atc tgc gcc ctc att ggg atc ctc acg ggc ctc gtg gcc tgc ttc att 384
Ile Cys Ala Leu Ile Gly Ile Leu Thr Gly Leu Val Ala Cys Phe Ile
115 120 125
gac atc gtg gtg gaa aac ctg gct ggc ctc aag tac agg gtc atc aag 432
Asp Ile Val Val Glu Asn Leu Ala Gly Leu Lys Tyr Arg Val Ile Lys
130 135 140
ggc aat atc gac aag ttc aca gag aag ggc gga ctg tcc ttc tcc ctg 480
Gly Asn Ile Asp Lys Phe Thr Glu Lys Gly Gly Leu Ser Phe Ser Leu
145 150 155 160
ttg ctg tgg gcc acg ctg aac gcc gcc ttc gtg ctc gtg ggc tct gtg 528

Leu	Leu	Trp	Ala	Thr	Leu	Asn	Ala	Ala	Phe	Val	Leu	Val	Gly	Ser	Val		
				165					170					175			
att	gtg	gct	ttc	ata	gag	ccg	gtg	gct	gct	ggc	agc	gga	atc	ccc	cag	576	
Ile	Val	Ala	Phe	Ile	Glu	Pro	Val	Ala	Ala	Gly	Ser	Gly	Ile	Pro	Gln		
			180					185					190				
atc	aag	tgc	ttc	ctc	aac	ggg	gtg	aag	atc	ccc	cac	gtg	gtg	cgg	ctc	624	
Ile	Lys	Cys	Phe	Leu	Asn	Gly	Val	Lys	Ile	Pro	His	Val	Val	Arg	Leu		
		195					200					205					
aag	acg	ttg	gtg	atc	aaa	gtg	tcc	ggg	gtg	atc	ctg	tcc	gtg	gtc	ggg	672	
Lys	Thr	Leu	Val	Ile	Lys	Val	Ser	Gly	Val	Ile	Leu	Ser	Val	Val	Gly		
	210					215					220						
ggc	ctg	gcc	gtg	gga	aag	gaa	ggg	ccg	atg	atc	cac	tca	ggg	tca	gtg	720	
Gly	Leu	Ala	Val	Gly	Lys	Glu	Gly	Pro	Met	Ile	His	Ser	Gly	Ser	Val		
225					230					235					240		
att	gcc	gcc	ggg	atc	tct	cag	gga	agg	tca	agc	tca	ctg	aaa	cga	gat	768	
Ile	Ala	Ala	Gly	Ile	Ser	Gln	Gly	Arg	Ser	Ser	Ser	Leu	Lys	Arg	Asp		
				245					250					255			
ttc	aag	atc	ttc	gag	tac	ctc	cgc	aga	gac	aca	gag	aag	cgg	gac	ttc	816	
Phe	Lys	Ile	Phe	Glu	Tyr	Leu	Arg	Arg	Asp	Thr	Glu	Lys	Arg	Asp	Phe		
			260					265					270				
gtc	tcc	gca	ggg	gct	gcg	gcc	gga	gtg	tca	gcg	gcg	ttt	gga	gcc	ccc	864	
Val	Ser	Ala	Gly	Ala	Ala	Ala	Gly	Val	Ser	Ala	Ala	Phe	Gly	Ala	Pro		
		275					280					285					
gtg	ggg	ggg	gtc	ctg	ttc	agc	ttg	gag	gag	ggg	gcg	tcc	ttc	tgg	aac	912	
Val	Gly	Gly	Val	Leu	Phe	Ser	Leu	Glu	Glu	Gly	Ala	Ser	Phe	Trp	Asn		
	290					295					300						
cag	ttc	ctg	acc	tgg	agg	atc	ttc	ttt	gct	tcc	atg	atc	tcc	acg	ttc	960	
Gln	Phe	Leu	Thr	Trp	Arg	Ile	Phe	Phe	Ala	Ser	Met	Ile	Ser	Thr	Phe		
305					310					315					320		
acc	ctg	aat	ttt	gtt	ctg	agc	att	tac	cac	ggg	aac	atg	tgg	gac	ctg	1008	
Thr	Leu	Asn	Phe	Val	Leu	Ser	Ile	Tyr	His	Gly	Asn	Met	Trp	Asp	Leu		
				325					330					335			
tcc	agc	cca	ggc	ctc	atc	aac	ttc	gga	agg	ttt	gac	tcg	gag	aaa	atg	1056	
Ser	Ser	Pro	Gly	Leu	Ile	Asn	Phe	Gly	Arg	Phe	Asp	Ser	Glu	Lys	Met		
			340					345					350				
gcc	tac	acg	atc	cac	gag	atc	ccg	gtc	ttc	atc	gcc	atg	ggc	gtg	gtg	1104	
Ala	Tyr	Thr	Ile	His	Glu	Ile	Pro	Val	Phe	Ile	Ala	Met	Gly	Val	Val		
		355					360					365					
ggc	ggg	gtg	ctt	gga	gca	gtg	ttc	aat	gcc	ttg	aac	tac	tgg	ctg	acc	1152	
Gly	Gly	Val	Leu	Gly	Ala	Val	Phe	Asn	Ala	Leu	Asn	Tyr	Trp	Leu	Thr		
	370					375					380						
atg	ttt	cga	atc	agg	tac	atc	cac	cgg	ccc	tgc	ctg	cag	gtg	att	gag	1200	
Met	Phe	Arg	Ile	Arg	Tyr	Ile	His	Arg	Pro	Cys	Leu	Gln	Val	Ile	Glu		
385					390					395					400		
gcc	gtg	ctg	gtg	gcc	gcc	gtc	acg	gcc	aca	gtt	gcc	ttc	gtg	ctg	atc	1248	
Ala	Val	Leu	Val	Ala	Ala	Val	Thr	Ala	Thr	Val	Ala	Phe	Val	Leu	Ile		
				405				410					415				
tac	tcg	tcg	cgg	gat	tgc	cag	ccc	ctg	cag	ggg	ggc	tcc	atg	tcc	tac	1296	
Tyr	Ser	Ser	Arg	Asp	Cys	Gln	Pro	Leu	Gln	Gly	Gly	Ser	Met	Ser	Tyr		
			420					425					430				
ccg	ctg	cag	ctc	ttt	tgt	gca	gat	ggc	gag	tac	aac	tcc	atg	gct	gcg	1344	

Pro	Leu	Gln	Leu	Phe	Cys	Ala	Asp	Gly	Glu	Tyr	Asn	Ser	Met	Ala	Ala	
		435					440					445				
gcc	ttc	ttc	aac	acc	ccg	gag	aag	agc	gtg	gtg	agc	ctc	ttc	cac	gac	1392
Ala	Phe	Phe	Asn	Thr	Pro	Glu	Lys	Ser	Val	Val	Ser	Leu	Phe	His	Asp	
	450					455					460					
ccg	cca	ggc	tcc	tac	aac	ccc	ctg	acc	ctc	ggc	ctg	ttc	acg	ctg	gtc	1440
Pro	Pro	Gly	Ser	Tyr	Ala	Pro	Leu	Thr	Leu	Gly	Leu	Phe	Thr	Leu	Val	
465					470					475					480	
tac	ttc	ttc	ctg	gcc	tgc	tgg	acc	tac	ggg	ctc	acg	gtg	tct	gcc	ggg	1488
Tyr	Phe	Phe	Leu	Ala	Cys	Trp	Thr	Tyr	Gly	Leu	Thr	Val	Ser	Ala	Gly	
				485					490					495		
gtc	ttc	atc	ccg	tcc	ctg	ctc	atc	ggg	gct	gcc	tgg	ggc	cgg	ctc	ttt	1536
Val	Phe	Ile	Pro	Ser	Leu	Leu	Ile	Gly	Ala	Ala	Trp	Gly	Arg	Leu	Phe	
			500					505					510			
ggg	atc	tcc	ctg	tcc	tac	ctc	acg	ggg	gcg	gcg	atc	tgg	gcg	gac	ccc	1584
Gly	Ile	Ser	Leu	Ser	Tyr	Leu	Thr	Gly	Ala	Ala	Ile	Trp	Ala	Asp	Pro	
		515					520					525				
ggc	aaa	tac	gcc	ctg	atg	gga	gct	gct	gcc	cag	ctg	ggc	ggg	att	gtg	1632
Gly	Lys	Tyr	Ala	Leu	Met	Gly	Ala	Ala	Ala	Gln	Leu	Gly	Gly	Ile	Val	
	530					535					540					
cgg	atg	aca	ctg	agc	ctg	acc	gtc	atc	atg	atg	gag	gcc	acc	agc	aac	1680
Arg	Met	Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Val	Ile	Met	Met	Glu	Ala	Thr	Ser	Asn	
545					550					555					560	
gtg	acc	tac	ggc	ttc	ccc	atc	atg	ctg	gtg	ctc	atg	acc	gcc	aag	atc	1728
Val	Thr	Tyr	Gly	Phe	Pro	Ile	Met	Leu	Val	Leu	Met	Thr	Ala	Lys	Ile	
				565					570					575		
gtg	ggc	gac	gtc	ttc	att	gag	ggc	ctg	tac	gac	atg	cac	att	cag	ctg	1776
Val	Gly	Asp	Val	Phe	Ile	Glu	Gly	Leu	Tyr	Asp	Met	His	Ile	Gln	Leu	
			580					585					590			
cag	agt	gtg	ccc	ttc	ctg	cac	tgg	gag	gcc	ccg	gtc	acc	tca	cac	tca	1824
Gln	Ser	Val	Pro	Phe	Leu	His	Trp	Glu	Ala	Pro	Val	Thr	Ser	His	Ser	
		595					600					605				
ctc	act	gcc	agg	gag	gtg	atg	agc	aca	cca	gtg	acc	tgc	ctg	agg	cgg	1872
Leu	Thr	Ala	Arg	Glu	Val	Met	Ser	Thr	Pro	Val	Thr	Cys	Leu	Arg	Arg	
	610					615					620					
cgt	gag	aag	gtc	ggc	gtc	att	gtg	gac	gtg	ctg	agc	gac	acg	gcg	tcc	1920
Arg	Glu	Lys	Val	Gly	Val	Ile	Val	Asp	Val	Leu	Ser	Asp	Thr	Ala	Ser	
625					630					635					640	
aat	cac	aac	ggc	ttc	ccc	gtg	gtg	gag	cat	gcc	gat	gac	acc	cag	cct	1968
Asn	His	Asn	Gly	Phe	Pro	Val	Val	Glu	His	Ala	Asp	Asp	Thr	Gln	Pro	
				645					650					655		
gcc	cgg	ctc	cag	ggc	ctg	atc	ctg	cgc	tcc	cag	ctc	atc	gtt	ctc	cta	2016
Ala	Arg	Leu	Gln	Gly	Leu	Ile	Leu	Arg	Ser	Gln	Leu	Ile	Val	Leu	Leu	
			660					665					670			
aag	cac	aag	gtg	ttt	gtg	gag	cgg	tcc	aac	ctg	ggc	ctg	gta	cag	cgg	2064
Lys	His	Lys	Val	Phe	Val	Glu	Arg	Ser	Asn	Leu	Gly	Leu	Val	Gln	Arg	
		675					680					685				
cgc	ctg	agg	ctg	aag	gac	ttc	cga	gac	gcc	tac	ccg	cgc	ttc	cca	ccc	2112
Arg	Leu	Arg	Leu	Lys	Asp	Phe	Arg	Asp	Ala	Tyr	Pro	Arg	Phe	Pro	Pro	
	690					695					700					
atc	cag	tcc	atc	cac	gtg	tcc	cag	gac	gag	cgg	gag	tgc	acc	atg	gac	2160

Ile	Gln	Ser	Ile	His	Val	Ser	Gln	Asp	Glu	Arg	Glu	Cys	Thr	Met	Asp		
705					710					715					720		
ctc	tcc	gag	ttc	atg	aac	ccc	tcc	ccc	tac	acg	gtg	ccc	cag	gag	gcg	2208	
Leu	Ser	Glu	Phe	Met	Asn	Pro	Ser	Pro	Tyr	Thr	Val	Pro	Gln	Glu	Ala		
				725					730					735			
tcg	ctc	cca	cgg	gtg	ttc	aag	ctg	ttc	cgg	gcc	ctg	ggc	ctg	cgg	cac	2256	
Ser	Leu	Pro	Arg	Val	Phe	Lys	Leu	Phe	Arg	Ala	Leu	Gly	Leu	Arg	His		
			740					745					750				
ctg	gtg	gtg	gtg	gac	aac	cgc	aat	cag	ggt	gtc	ggg	ttg	gtg	acc	agg	2304	
Leu	Val	Val	Val	Asp	Asn	Arg	Asn	Gln	Val	Val	Gly	Leu	Val	Thr	Arg		
			755				760					765					
aag	gac	ctc	gcc	agg	tac	cgc	ctg	gga	aag	aga	ggc	ttg	gag	gag	ctc	2352	
Lys	Asp	Leu	Ala	Arg	Tyr	Arg	Leu	Gly	Lys	Arg	Gly	Leu	Glu	Glu	Leu		
	770					775					780						
tcg	ctg	gcc	cag	acg	tga	ggcccagccc	tgcccataat	ggg								2393	
Ser	Leu	Ala	Gln	Thr													
785					790												

<210> 14
 <211> 789
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 14																	
Asp	Glu	Glu	Ala	Ala	Pro	Leu	Leu	Arg	Arg	Thr	Ala	Arg	Pro	Gly	Gly		
1				5					10					15			
Gly	Thr	Pro	Leu	Leu	Asn	Gly	Ala	Gly	Pro	Gly	Ala	Ala	Arg	Gln	Ser		
			20					25					30				
Pro	Arg	Ser	Ala	Leu	Phe	Arg	Val	Gly	His	Met	Ser	Ser	Val	Glu	Leu		
		35					40					45					
Asp	Asp	Glu	Leu	Leu	Asp	Pro	Asp	Met	Asp	Pro	Pro	His	Pro	Phe	Pro		
	50					55				60							
Lys	Glu	Ile	Pro	His	Asn	Glu	Lys	Leu	Leu	Ser	Leu	Lys	Tyr	Glu	Ser		
	65				70				75					80			
Leu	Asp	Tyr	Asp	Asn	Ser	Glu	Asn	Gln	Leu	Phe	Leu	Glu	Glu	Glu	Arg		
				85				90					95				
Arg	Ile	Asn	His	Thr	Ala	Phe	Arg	Thr	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Trp	Val		
		100						105					110				
Ile	Cys	Ala	Leu	Ile	Gly	Ile	Leu	Thr	Gly	Leu	Val	Ala	Cys	Phe	Ile		
	115						120					125					
Asp	Ile	Val	Val	Glu	Asn	Leu	Ala	Gly	Leu	Lys	Tyr	Arg	Val	Ile	Lys		
	130					135					140						
Gly	Asn	Ile	Asp	Lys	Phe	Thr	Glu	Lys	Gly	Gly	Leu	Ser	Phe	Ser	Leu		
	145				150				155						160		
Leu	Leu	Trp	Ala	Thr	Leu	Asn	Ala	Ala	Phe	Val	Leu	Val	Gly	Ser	Val		
				165					170					175			
Ile	Val	Ala	Phe	Ile	Glu	Pro	Val	Ala	Ala	Gly	Ser	Gly	Ile	Pro	Gln		
		180						185					190				
Ile	Lys	Cys	Phe	Leu	Asn	Gly	Val	Lys	Ile	Pro	His	Val	Val	Arg	Leu		
		195					200					205					
Lys	Thr	Leu	Val	Ile	Lys	Val	Ser	Gly	Val	Ile	Leu	Ser	Val	Val	Gly		
	210					215						220					
Gly	Leu	Ala	Val	Gly	Lys	Glu	Gly	Pro	Met	Ile	His	Ser	Gly	Ser	Val		
	225					230				235					240		
Ile	Ala	Ala	Gly	Ile	Ser	Gln	Gly	Arg	Ser	Ser	Ser	Leu	Lys	Arg	Asp		
				245					250					255			
Phe	Lys	Ile	Phe	Glu	Tyr	Leu	Arg	Arg	Asp	Thr	Glu	Lys	Arg	Asp	Phe		
			260					265					270				
Val	Ser	Ala	Gly	Ala	Ala	Ala	Gly	Val	Ser	Ala	Ala	Phe	Gly	Ala	Pro		
		275					280					285					
Val	Gly	Gly	Val	Leu	Phe	Ser	Leu	Glu	Glu	Gly	Ala	Ser	Phe	Trp	Asn		
	290					295					300						

Referenzen:

- (1) Clarke LL, Grubb BR, Gabriel SE, Smithies O, Koller BH, Boucher RC (1992) Defective epithelial chloride transport in a gene-targeted mouse model of cystic fibrosis. *Science* 257:1125-1128.
- (2) Dorin JR, Dickinson P, Alton EW, Smith SN, Geddes DM, Stevenson BJ, Kimber WL, Fleming S, Clarke AR, Hooper ML, et al (1992) Cystic fibrosis in the mouse by targeted insertional mutagenesis. *Nature* 359:211-215
- (3) Ratcliff R, Evans MJ, Doran J, Wainwright BJ, Williamson R, Colledge WH (1992) Disruption of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene in embryonic stem cells by gene targeting. *Transgenic Res.* 1:177-181.
- (4) Ratcliff R, Evans MJ, Cuthbert AW, MacVinish LJ, Foster D, Anderson JR, Colledge WH (1993) Production of a severe cystic fibrosis mutation in mice by gene targeting. *Nature Genet.* 4:35-41.
- (5) Matsumura Y, Uchida S, Kondo Y, Miyazaki H, Ko SB, Hayama A, Morimoto T, Liu W, Arisawa M, Sasaki S, Marumo F (1999) Overt nephrogenic diabetes insipidus in mice lacking the CLC-K1 chloride channel. *Nature Genet.* 21:95-98.
- (6) Brenner R, Perez GJ, Bonev AD, Eckman DM, Kosek JC, Wiler SW, Patterson AJ, Nelson MT, Aldrich RW (2000) Vasoregulation by the beta1 subunit of the calcium-activated potassium channel. *Nature* 407:870-876.
- (7) Lee MP, Ravenel JD, Hu RJ, Lustig LR, Tomaselli G, Berger RD, Brandenburg SA, Litzi TJ, Bunton TE, Limb C, Francis H, Gorelikow M, Gu H, Washington K, Argani P, Goldenring JR, Coffey RJ, Feinberg AP (2000) Targeted disruption of the *kvlqt1* gene causes deafness and gastric hyperplasia in mice. *J Clin Invest* 106:1447-1455.
- (8) Piwon N, Günther W, Schwake M, Bösl MR, Jentsch TJ (2000) CIC-5 Cl⁻-channel disruption impairs endocytosis in a mouse model for Dent's disease. *Nature* 408:369-373.
- (9) Steinmeyer K, Lorenz C, Pusch M, Koch MC, Jentsch TJ (1994) Multimeric structure of ClC-1 chloride channel revealed by mutations in dominant myotonia congenita (Thomsen). *EMBO J* 13:737-743.
- (10) Gronemeier M, Condie A, Prosser J, Steinmeyer K, Jentsch TJ, Jockusch H (1994) Nonsense and missense mutations in the muscular chloride channel gene *Clc-1* of myotonic mice. *J Biol Chem* 269:5963-5967.

- (11) Lorenz C, Meyer-Kleine C, Steinmeyer K, Koch MC, Jentsch TJ (1994) Genomic organization of the human muscle chloride channel CIC-1 and analysis of novel mutations leading to Becker-type myotonia. Hum Mol Genet 3:941-946.
- (12) Meyer-Kleine C, Steinmeyer K, Ricker K, Jentsch TJ, Koch MC. (1995) Spectrum of mutations in the major human skeletal muscle chloride channel gene (CLCN1) leading to myotonia. Am J Hum Genet. 57:1325-1334.
- (13) Pusch M, Steinmeyer K, Koch MC, Jentsch TJ. (1995) Mutations in dominant human myotonia congenita drastically alter the voltage dependence of the CIC-1 chloride channel. Neuron 15:1455-1463.
- (14) Lloyd SE, Pearce SH, Fisher SE, Steinmeyer K, Schwappach B, Scheinman SJ, Harding B, Bolino A, Devoto M, Goodyer P, Rigden SP, Wrong O, Jentsch TJ, Craig IW, Thakker RV. A common molecular basis for three inherited kidney stone diseases. Nature 379:445-449.
- (15) Lloyd SE, Pearce SH, Gunther W, Kawaguchi H, Igarashi T, Jentsch TJ, Thakker RV. (1997) Idiopathic low molecular weight proteinuria associated with hypercalciuric nephrocalcinosis in Japanese children is due to mutations of the renal chloride channel (CLCN5). J Clin Invest. 99:967-974.
- (16) Lloyd SE, Gunther W, Pearce SH, Thomson A, Bianchi ML, Bosio M, Craig IW, Fisher SE, Scheinman SJ, Wrong O, Jentsch TJ, Thakker RV. (1997) Characterisation of renal chloride channel, CLCN5, mutations in hypercalciuric nephrolithiasis (kidney stones) disorders. Hum Mol Genet 6:1233-1239.
- (17) Schmidt-Rose T, Jentsch TJ. (1997) Reconstitution of functional voltage-gated chloride channels from complementary fragments of CLC-1. J Biol Chem 272:20515-20521.
- (18) Schwappach B, Stobrawa S, Hechenberger M, Steinmeyer K, Jentsch TJ. (1998) Golgi localization and functionally important domains in the NH2 and COOH terminus of the yeast CLC putative chloride channel Geflp. J Biol Chem 273:15110-15118.
- (19) Kubisch C, Schmidt-Rose T, Fontaine B, Bretag AH, Jentsch TJ. (1998) CLC-1 chloride channel mutations in myotonia congenita: variable penetrance of mutations shifting the voltage dependence. Hum Mol Genet. 7:1753-1760.
- (20) Igarashi T, Gunther W, Sekine T, Inatomi J, Shiraga H, Takahashi S, Suzuki J, Tsuru N, Yanagihara T, Shimazu M, Jentsch TJ, Thakker RV. (1998) Functional characterization of renal chloride channel, CLCN5, mutations

associated with Dent's Japan disease. *Kidney Int.* 54:1850-1856.

- (21) Friedrich T, Breiderhoff T, Jentsch TJ. (1999) Mutational analysis demonstrates that ClC-4 and ClC-5 directly mediate plasma membrane currents. *J Biol Chem* 274:896-902.
- (22) Yamamoto K, Cox JP, Friedrich T, Christie PT, Bald M, Houtman PN, Lapsley MJ, Patzer L, Tsimaratos M, Van'T Hoff WG, Yamaoka K, Jentsch TJ, Thakker RV. (2000) Characterization of renal chloride channel (CLCN5) mutations in Dent's disease. *J Am Soc Nephrol* 11:1460-1468.
- (23) Piwon N, Günther W, Schwake M, Bösl MR, Jentsch TJ. (2000) ClC-5 Cl-channel disruption impairs endocytosis in a mouse model for Dent's disease. *Nature* 408:369-373.
- (24) Fahlke C. (2000) Molecular mechanisms of ion conduction in ClC-type chloride channels: lessons from disease-causing mutations. *Kidney Int* 57:780-786.
- (25) Jen KY, Gewirtz AM. (2000) Suppression of gene expression by targeted disruption of messenger RNA: available options and current strategies. *Stem Cells* 18:307-319.
- (26) Marschall P, Thomson JB, Eckstein F. Inhibition of gene expression with ribozymes. *Cell Mol Neurobiol.* 14:523-538.
- (27) Lewalle P, Martiat P (1993) Inhibition of P210 expression in chronic myeloid leukaemia: oligonucleotides and/or transduced antisense sequences. *Leuk Lymphoma* 11 Suppl 1:139-43.
- (28) Montrose-Rafizadeh C, Kole J, Bartkowski LM, Lee LH, Blackmon DL, Behnken SE, Gearhart JD, Cohn JA, Montrose MH (1997). Gene targeting of a CFTR allele in HT29 human epithelial cells. *J Cell Physiol* 170:299-308
- (29) Luyckx VA, Leclercq B, Dowland LK, Yu AS (1999) Diet-dependent hypercalciuria in transgenic mice with reduced CLC5 chloride channel expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:12174-12179
- (30) Liu R, Li W, Karin NJ, Bergh JJ, Adler-Storthz K, Farach-Carson MC (2000) Ribozyme ablation demonstrates that the cardiac subtype of the voltage-sensitive calcium channel is the molecular transducer of 1, 25-dihydroxyvitamin D3-stimulated calcium influx in osteoblastic cells. *J Biol Chem* 275:8711-8718
- (31) Nakao M, Furukawa K, Satoh E, Ono K, Iijima T (2000) Inhibition by antisense oligonucleotides of plasma membrane Ca²⁺ ATPase in vascular endothelial cells. *Eur J Pharmacol* 387:273-277.

- (32) Tottene A, Volsen S, Pietrobon D (2000) α subunits form the pore of three cerebellar R-type calcium channels with different pharmacological and permeation properties. *J Neurosci* 20:171-178.
- (33) Brussaard AB (1997) Antisense oligonucleotides induce functional deletion of ligand gated ion channels in cultured neurons and brain explants. *J Neurosci Methods*. 71:55-64.
- (34) Vincent A, Lautermilch NJ, Spitzer NC (2000) Antisense suppression of potassium channel expression demonstrates its role in maturation of the action potential. *J Neurosci* 20:6087-6094.
- (35) Wang L, Chen L, Jacob TJ (2000) The role of ClC-3 in volume-activated chloride currents and volume regulation in bovine epithelial cells demonstrated by antisense inhibition. *J Physiol*. 524: 63-75.
- (36) Leconte L, Barnstable CJ. (2000) Impairment of rod cGMP-gated channel α -subunit expression leads to photoreceptor and bipolar cell degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41:917-926.
- (37) Gokhan S, Song Q, Mehler MF (1998) Generation and regulation of developing immortalized neural cell lines. *Methods* 16:345-358.
- (38) Katakura Y, Alam S, Shirahata S. (1998) Immortalization by gene transfection. *Methods Cell Biol* 57:69-91.
- (39) Yeager TR, Reddel RR (1999) Constructing immortalized human cell lines. *Curr Opin Biotechnol* 10:465-469.
- (40) Jat PS, Noble MD, Ataliotis P, Tanaka Y, Yannoutsos N, Larsen L, Kioussis D. (1991) Direct derivation of conditionally immortal cell lines from an H-2Kb-tsA58 transgenic mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:5096-5100.
- (41) Whitehead RH, VanEeden PE, Noble MD, Ataliotis P, Jat PS. (1993) Establishment of conditionally immortalized epithelial cell lines from both colon and small intestine of adult H-2Kb-tsA58 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:587-591.
- (42) D'Abaco GM, Whitehead RH, Burgess AW (1996) Synergy between Apc min and an activated ras mutation is sufficient to induce colon carcinomas. *Mol Cell Biol* 16:884-891.
- (43) Vandewalle A. (1999) Immortalized kidney cells derived from transgenic mice harboring L-type pyruvate kinase and vimentin promoters. *Exp Nephrol* 7:386-393.
- (44) Miesenbock G, De Angelis DA, Rothman JE (1998) Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-

sensitive green fluorescent proteins. Nature 394: 192-195.

- (45) Llopis J, McCaffery JM, Miyawaki A, Farquhar MG, Tsien RY. (1998) Measurement of cytosolic, mitochondrial, and Golgi pH in single living cells with green fluorescent proteins. Proc Natl Acad Sci U S A. 95:6803-68088.
- (46) Kneen M, Farinas J, Li Y, Verkman AS (1998) Green fluorescent protein as a noninvasive intracellular pH indicator. Biophys J 74:1591-1599.
- (47) Wu MM, Llopis J, Adams SR, McCaffery JM, Teter K, Kulomaa MS, Machen TE, Moore HP, Tsien RY. (2000) Studying organelle physiology with fusion protein-targeted avidin and fluorescent biotin conjugates. Methods Enzymol. 327:546-564.
- (48) Schapiro FB, Grinstein S. (2000) Determinants of the pH of the Golgi complex. J Biol Chem 275:21025-21032.
- (49) Demaurex N, Furuya W, D'Souza S, Bonifacino JS, Grinstein S (1998) Mechanism of acidification of the trans-Golgi network (TGN). In situ measurements of pH using retrieval of TGN38 and furin from the cell surface. J Biol Chem 273:2044-2051.
- (50) Diwu Z, Chen CS, Zhang C, Klaubert DH, Haugland RP. (1999) A novel acidotropic pH indicator and its potential application in labeling acidic organelles of live cells. Chem Biol 6:411-418.
- (51) Overly CC, Lee KD, Berthiaume E, Hollenbeck PJ. (1995) Quantitative measurement of intraorganelle pH in the endosomal-lysosomal pathway in neurons by using ratio-metric imaging with pyranine. Proc Natl Acad Sci U S A 92:3156-3160.
- (52) Boyde A, Ali NN, Jones SJ. (1984) Resorption of dentine by isolated osteoclasts in vitro. Br Dent J 156:216-220
- (53) Chambers TJ, Revell PA, Fuller K, Athanasou NA. (1984) Resorption of bone by isolated rabbit osteoclasts. J Cell Sci. 1984 Mar;66:383-399.
- (54) Sun L, Adebajo OA, Moonga BS, Corisdeo S, Anandatheerthavarada HK, Biswas G, Arakawa T, Hakeda Y, Koval A, Sodam B, Bevis PJ, Moser AJ, Lai FA, Epstein S, Troen BR, Kumegawa M, Zaidi M (1999) CD38/ADP-ribosyl cyclase: A new role in the regulation of osteoclastic bone resorption. J Cell Biol 146:1161-1172
- (55) Okazaki R, Toriumi M, Fukumoto S, Miyamoto M, Fujita T, Tanaka K, Takeuchi Y (1999) Thiazolidinediones inhibit osteoclast-like cell formation and bone resorption in vitro. Endocrinology 140:5060-5065

- (56) Udagawa N, Takahashi N, Jimi E, Matsuzaki K, Tsurukai T, Itoh K, Nakagawa N, Yasuda H, Goto M, Tsuda E, Higashio K, Gillespie MT, Martin TJ, Suda T (1999) Osteoblasts/stromal cells stimulate osteoclast activation through expression of osteoclast differentiation factor/RANKL but not macrophage colony-stimulating factor: receptor activator of NF-kappa B ligand. *Bone* 25:517-523
- (57) Redey SA, Razzouk S, Rey C, Bernache-Assollant D, Leroy G, Nardin M, Cournot G (1999) Osteoclast adhesion and activity on synthetic hydroxyapatite, carbonated hydroxyapatite, and natural calcium carbonate: relationship to surface energies. *J Biomed Mater Res* 45:140-147
- (58) Ilvesaro J, Vaananen K, Tuukkanen J (2000) Bone-resorbing osteoclasts contain gap-junctional connexin-43. *J Bone Miner Res* 15:919-926.
- (59) Baron R, Neff L, Louvard D, Courtoy PJ. (1985) Cell-mediated extracellular acidification and bone resorption: evidence for a low pH in resorbing lacunae and localization of a 100-kD lysosomal membrane protein at osteoclast ruffled border. *J Cell Biol.* 101:2210-2222.
- (60) Inoue M, Yoshida H, Akisaka T (1999) Visualization of acidic compartments in cultured osteoclasts by use of an acidotrophic amine as a marker for low pH. *Cell Tissue Res* 298:527-537.
- (61) Laitala-Leinonen T, Lowik C, Papapoulos S, Vaananen HK (1999) Inhibition of intravacuolar acidification by antisense RNA decreases osteoclast differentiation and bone resorption in vitro. *J Cell Sci* 112:3657-3666.
- (62) Shioi J, Naito S, Ueda T. (1989) Glutamate uptake into synaptic vesicles of bovine cerebral cortex and electrochemical potential difference of proton across the membrane. *Biochem J.* 258:499-504.
- (63) Tabb JS, Kish PE, Van Dyke R, Ueda T. (1992) Glutamate transport into synaptic vesicles. Roles of membrane potential, pH gradient, and intravesicular pH. *J Biol Chem.* 267:15412-15418.
- (64) Hartinger J, Jahn R. (1993) An anion binding site that regulates the glutamate transporter of synaptic vesicles. *J Biol Chem.* 268:23122-23127.
- (65) Maycox PR, Deckwerth T, Hell JW, Jahn R. (1988) Glutamate uptake by brain synaptic vesicles. Energy dependence of transport and functional reconstitution in proteoliposomes. *J Biol Chem.* 263:15423-15428.
- (66) Hell JW, Maycox PR, Stadler H, Jahn R. (1988) Uptake of GABA by rat brain synaptic vesicles isolated by a new procedure. *EMBO J.* 7:3023-3029.

- (67) Hell JW, Maycox PR, Jahn R. (1990) Energy dependence and functional reconstitution of the gamma-aminobutyric acid carrier from synaptic vesicles. *J Biol Chem.* 265:2111-2117
- (68) Thomas-Reetz A, Hell JW, During MJ, Walch-Solimena C, Jahn R, De Camilli P. (1993) A gamma-aminobutyric acid transporter driven by a proton pump is present in synaptic-like microvesicles of pancreatic beta cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90:5317-5321.
- (69) Mellman I (1992) The importance of being acid: the role of acidification in intracellular membrane traffic. *J. exp. Biol.* 172: 39-45.
- (70) Presley JF, Mayor S, Dunn KW, Johnson LS, McGraw TE, Maxfield FR. (1993) The End2 mutation in CHO cells slows the exit of transferrin receptors from the recycling compartment but bulk membrane recycling is unaffected. *J Cell Biol* 122:1231-1241.
- (71) Presley JF, Mayor S, McGraw TE, Dunn KW, Maxfield FR. (1997) Bafilomycin A1 treatment retards transferrin receptor recycling more than bulk membrane recycling. *J Biol Chem.* 272:13929-13936.
- (72) Johnson LS, Dunn KW, Pytowski B, McGraw TE. (1993) Endosome acidification and receptor trafficking: bafilomycin A1 slows receptor externalization by a mechanism involving the receptor's internalization motif. *Mol Biol Cell* 4:1251-1266.
- (73) Chapman RE, Munro S. (1994) Retrieval of TGN proteins from the cell surface requires endosomal acidification. *EMBO J.* 13:2305-2312.
- (74) Clague MJ, Urbe S, Aniento F, Gruenberg J. (1994) Vacuolar ATPase activity is required for endosomal carrier vesicle formation. *J Biol Chem.* 269:21-24.
- (75) Tycko B, Maxfield FR (1982) Rapid acidification of endocytotic vesicles containing α_2 -macroglobulin. *Cell* 28: 643-651.
- (76) Zen K, Biwersi J, Periasamy N, Verkman AS (1992) Second messengers regulate endosomal acidification in Swiss 3T3 fibroblasts. *J Cell Biol* 119: 99-110.
- (77) Siegel MS, Isacoff EY (1997) A genetically encoded optical probe of membrane voltage. *Neuron* 19:735-741.
- (78) Gene Targeting. A Practical Approach. Editor: Joyner, A.L. IRL Press at Oxford University Press (Oxford, New York, Tokyo) (1993).

- (79) Brandt S, Jentsch TJ (1995) ClC-6 and ClC-7 are two novel broadly expressed members of the CLC chloride channel family. *FEBS Letters* 377:15-20.
- (80) Kornak U, Bosl MR, Kubisch C. (1999) Complete genomic structure of the CLCN6 and CLCN7 putative chloride channel genes. *Biochim Biophys Acta* 1447:100-106.
- (81) Reimer RJ, Fon EA, Edwards RH. (1998) Vesicular neurotransmitter transport and the presynaptic regulation of quantal size. *Curr Opin Neurobiol.* 8:405-412.
- (82) Gasnier B. (2000) The loading of neurotransmitters into synaptic vesicles. *Biochimie* 82:327-337.
- (83) Kawasaki M, Uchida S, Monkawa T, Miyawaki A, Mikoshiba K, Marumo F, Sasaki S. (1994) Cloning and expression of a protein kinase C-regulated chloride channel abundantly expressed in rat brain neuronal cells. *Neuron.* 12:597-604.
- (84) Borsani G, Rugarli EI, Taglialatela M, Wong C, Ballabio A. (1995) Characterization of a human and murine gene (CLCN3) sharing similarities to voltage-gated chloride channels and to a yeast integral membrane protein. *Genomics.* 27:131-141.
- (85) Sterrer S, Henco K. (1997) Fluorescence correlation spectroscopy (FCS) - a highly sensitive method to analyze drug/target interactions. *J Recept Signal Transduct Res.* 17:511-520
- (86) Kask P, Palo K, Ullmann D, Gall K. (1999) Fluorescence-intensity distribution analysis and its application in biomolecular detection technology. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:13756-13561.
- (87) Palo K, Mets U, Jager S, Kask P, Gall K (2000) Fluorescence intensity multiple distributions analysis: concurrent determination of diffusion times and molecular brightness. *Biophys J* 79:2858-2866.
- (88) Schaertl S, Meyer-Almes FJ, Lopez-Calle E, Siemers A, Kramer J (2000) A novel and robust homogeneous fluorescence-based assay using nanoparticles for pharmaceutical screening and diagnostics. *J Biomol Screen* 5:227-238.
- (89) Karlsson R. (1994) Real-time competitive kinetic analysis of interactions between low-molecular-weight ligands in solution and surface-immobilized receptors. *Anal Biochem.* 221:142-151.
- (90) Beerheide W, Bernard HU, Tan YJ, Ganesan A, Rice WG, Ting AE. (1999) Potential drugs against cervical cancer: zinc-ejecting inhibitors of the human papillo-

mavirus type 16 E6 oncoprotein. J Natl Cancer Inst. 91:1211-1220.

- (91) Deckert F, Legay F. (2000) Development and validation of an IL-6 immuno-receptor assay based on surface plasmon resonance. J Pharm Biomed Anal. 23:403-412.
- (92) Frostell-Karlsson A, Remaeus A, Roos H, Andersson K, Borg P, Hamalainen M, Karlsson R. (2000) Biosensor analysis of the interaction between immobilized human serum albumin and drug compounds for prediction of human serum albumin binding levels. J Med Chem. 43:1986-1992.
- (93) Markgren PO, Hamalainen M, Danielson UH. (2000) Kinetic analysis of the interaction between HIV-1 protease and inhibitors using optical biosensor technology. Anal Biochem. 2000 Mar 1;279(1):71-8.
- (94) Williams C. (2000) Biotechnology match making: screening orphan ligands and receptors. Curr Opin Biotechnol 11:42-46.
- (95) Van Noorden CJ, Vogels IM, Everts V, Beertsen W. (1987) Localization of cathepsin B activity in fibroblasts and chondrocytes by continuous monitoring of the formation of a final fluorescent reaction product using 5-nitro-salicylaldehyde. Histochem J 19:483-487.
- (96) Xia L, Kilb J, Wex H, Li Z, Lipyansky A, Breuil V, Stein L, Palmer JT, Dempster DW, Bromme D (1999) Localization of rat cathepsin K in osteoclasts and resorption pits: inhibition of bone resorption and cathepsin K-activity by peptidyl vinyl sulfones. Biol Chem. 1999 Jun;380(6):679-87.

Patentansprüche:

1. Nukleinsäuresequenz, die für ein Protein aus der Gruppe bestehend aus den Chloridkanälen ClC-3, ClC-4, ClC-6 und ClC-7 kodiert, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäuresequenz durch Mutation, Trunkation oder ganz oder teilweise Deletion verändert ist.
2. Nicht-menschlicher Säuger, dessen Keim- und somatische Zellen für ein Protein aus der Gruppe bestehend aus den Chloridkanälen ClC-1, ClC-2, ClC-Ka, ClC-Kb, ClC-3, ClC-4, ClC-5, ClC-6 und/oder ClC-7 kodierende Nukleinsäuresequenzen enthalten, dadurch gekennzeichnet, daß die für ClC-3, ClC-4, ClC-6 und/oder ClC-7 kodierende(n) Nukleinsäuresequenz(en) gegenüber der natürlicherweise vorkommenden Nukleinsäuresequenz durch Mutation, Trunkation und/oder ganz oder teilweise Deletion verändert ist.
3. Nicht-menschlicher Säuger nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß zusätzlich die für ClC-1, ClC-2, ClC-Ka, ClC-Kb und/oder ClC-5 kodierende(n) Nukleinsäuresequenz(en) durch Mutation, Trunkation und/oder ganz oder teilweise Deletion verändert ist.
4. Zelllinie, die einen oder mehrere der Chloridkanäle aus der Gruppe bestehend aus ClC-1, ClC-2, ClC-Ka, ClC-Kb, ClC-3, ClC-4, ClC-5, ClC-6 und ClC-7 nicht oder nur vermindert exprimiert.
5. Zelllinie nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß sie den Chloridkanal ClC-7, nicht aber die Chloridkanäle ClC-3, ClC-4, ClC-5 und ClC-6, exprimiert.
6. Zelllinie nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß sie den Chloridkanal ClC-3, nicht aber die Chloridkanäle ClC-4, ClC-5, ClC-6 und ClC-7, exprimiert.

7. Zelllinie nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß sie den Chloridkanal ClC-4, nicht aber die Chloridkanäle ClC-3, ClC-5, ClC-6 und ClC-7, exprimiert.
8. Zelllinie nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß sie den Chloridkanal ClC-6, nicht aber die Chloridkanäle ClC-3, ClC-4, ClC-5 und ClC-7, exprimiert.
9. Verwendung eines genetisch veränderten, nicht-menschlichen Säugers, dessen Keim- und somatische Zellen für ein Protein aus der Gruppe bestehend aus den Chloridkanälen ClC-1, ClC-2, ClC-Ka, ClC-Kb, ClC-3, ClC-4, ClC-5, ClC-6 und/oder ClC-7 kodierende Nukleinsäuresequenzen enthalten, wobei eine oder mehrere dieser Nukleinsäuresequenzen gegenüber der natürlicherweise vorkommenden Nukleinsäuresequenz durch Mutation, Trunkation und/oder ganz oder teilweise Deletion verändert ist, zum Identifizieren und Testen von Substanzen, die geeignet sind, einen oder mehrere der Chloridkanäle zu inhibieren.
10. Verwendung eines genetisch veränderten, nicht-menschlichen Säugers, dessen Keim- und somatische Zellen für Proteine aus der Gruppe bestehend aus den Chloridkanälen ClC-1, ClC-2, ClC-Ka, ClC-Kb, ClC-3, ClC-4, ClC-5, ClC-6 und ClC-7 kodierende Nukleinsäuresequenzen enthalten, wobei eine oder mehrere dieser Nukleinsäuresequenzen gegenüber der natürlicherweise vorkommenden Nukleinsäuresequenz, nicht jedoch die für ClC-7 kodierende Sequenz, durch Mutation, Trunkation und/oder ganz oder teilweise Deletion verändert ist, zum Identifizieren und Testen von Substanzen, die geeignet sind, den Chloridkanal ClC-7 zu inhibieren.
11. Verwendung eines genetisch veränderten, nicht-menschlichen Säugers, dessen Keim- und somatische Zellen für Proteine aus der Gruppe bestehend aus den Chloridkanälen ClC-1, ClC-2, ClC-Ka, ClC-Kb, ClC-3, ClC-4, ClC-5, ClC-6 und ClC-7 kodierende Nukleinsäuresequenzen enthalten, wobei eine oder mehrere dieser Nukleinsäuresequenzen gegenüber der natürlicherweise vorkommenden Nukleinsäuresequenz, nicht jedoch die

für ClC-3 kodierende Sequenz, durch Mutation, Trunkation und/oder ganz oder teilweise Deletion verändert ist, zum Identifizieren und Testen von Substanzen, die geeignet sind, den Chloridkanal ClC-3 zu inhibieren.

12. Verwendung eines genetisch veränderten, nicht-menschlichen Säugers, dessen Keim- und somatische Zellen für Proteine aus der Gruppe bestehend aus den Chloridkanälen ClC-1, ClC-2, ClC-Ka, ClC-Kb, ClC-3, ClC-4, ClC-5, ClC-6 und ClC-7 kodierende Nukleinsäuresequenzen enthalten, wobei eine oder mehrere dieser Nukleinsäuresequenzen gegenüber der natürlicherweise vorkommenden Nukleinsäuresequenz, nicht jedoch die für ClC-4 kodierende Sequenz, durch Mutation, Trunkation und/oder ganz oder teilweise Deletion verändert ist, zum Identifizieren und Testen von Substanzen, die geeignet sind, den Chloridkanal ClC-4 zu inhibieren.
13. Verwendung eines genetisch veränderten, nicht-menschlichen Säugers, dessen Keim- und somatische Zellen für Proteine aus der Gruppe bestehend aus den Chloridkanälen ClC-1, ClC-2, ClC-Ka, ClC-Kb, ClC-3, ClC-4, ClC-5, ClC-6 und ClC-7 kodierende Nukleinsäuresequenzen enthalten, wobei eine oder mehrere dieser Nukleinsäuresequenzen gegenüber der natürlicherweise vorkommenden Nukleinsäuresequenz, nicht jedoch die für ClC-6 kodierende Sequenz, durch Mutation, Trunkation und/oder ganz oder teilweise Deletion verändert ist, zum Identifizieren und Testen von Substanzen, die geeignet sind, den Chloridkanal ClC-6 zu inhibieren.
14. Verwendung einer Zelllinie nach Anspruch 5 zum Identifizieren und Testen von Substanzen, die geeignet sind, den Chloridkanal ClC-7 zu inhibieren.
15. Verwendung nach Anspruch 14 zum Identifizieren und Testen von Wirkstoffen zur Behandlung von Osteoporose, Morbus Paget.

16. Verwendung einer Zelllinie nach Anspruch 6 zum Identifizieren und Testen von Substanzen, die geeignet sind, den Chloridkanal ClC-3 zu inhibieren.
17. Verwendung einer Zelllinie nach Anspruch 7 zum Identifizieren und Testen von Substanzen, die geeignet sind, den Chloridkanal ClC-4 zu inhibieren.
18. Verwendung einer Zelllinie nach Anspruch 8 zum Identifizieren und Testen von Substanzen, die geeignet sind, den Chloridkanal ClC-6 zu inhibieren.
19. Verwendung nach den Ansprüchen 14 und 16 bis 18 zum Identifizieren und Testen von Wirkstoffen, die als Psychopharmaka geeignet sind.
20. Verfahren zum Identifizieren und Testen von Substanzen, die geeignet sind, einen oder mehrere Chloridkanäle aus der Gruppe bestehend aus ClC-3, ClC-4, ClC-5, ClC-6 und/oder ClC-7 zu inhibieren, bei dem man
 - a) an Zellen nach den Ansprüchen 5 bis 8 den luminalen pH-Wert der den Kanal exprimierenden Kompartimente und/oder die Spannung über die den Kanal umschliessende Membran mißt,
 - b) die Zellen mit einer Substanz in Kontakt bringt und
 - c) an den Zellen erneut den luminalen pH-Wert der den Kanal exprimierenden Kompartimente und/oder die Spannung über die den Kanal umschliessende Membran mißt,

wobei der Unterschied zwischen dem pH-Wert und/oder der Membranspannung vor und nach Zugabe der Substanz die Aktivität der Substanz bestimmt.

21. Verfahren nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß man den pH-Wert durch Akkumulation von Substanzen in Kompartimenten mit einem bestimmten pH-Wert oder Nachweis von Indikatorsubstanzen, die bei pH-abhängigen Reaktionen in den Kompartiments gebildet werden, mißt.
22. Verfahren nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß man die Spannung durch Verwendung Spannungs-sensitiver Farbstoffe oder protein-kodierter Spannungssensoren mißt.
23. Verwendung von Substanzen, die den Chloridkanal ClC-7 ganz oder teilweise inhibieren, zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung von Osteoporose und Morbus Paget.
24. Verwendung von Substanzen, die den Chloridkanal ClC-3, ClC-4 ClC-6 und/oder ClC-7 ganz oder teilweise inhibieren, zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung von Erkrankungen aus der Gruppe bestehend aus neurologischen und neuromuskulären Erkrankungen sowie anderen Nervenkrankheiten.
25. Verwendung von Substanzen, die den Chloridkanal ClC-3, ClC-4 ClC-6 und/oder ClC-7 ganz oder teilweise inhibieren, zur Herstellung von Psychopharmaka.

Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Testsystem zur Identifizierung und zum Testen von Wirkstoffen, die auf die synaptische Transmission wirken (Wirkstoffe zur Behandlung neuronaler Erkrankungen), die die Endo-/Exozytose beeinflussen, die die Prozessierung von Proteinen beeinflussen und insbesondere von Wirkstoffen, die zur Behandlung der Osteoporose oder Morbus Paget, zur Behandlung neurologischer und neuromuskulärer Erkrankungen sowie anderer Nervenkrankheiten oder als Psychopharmaka verwendet werden können. Gegenstand der Erfindung ist ferner ein genetisch veränderter, nicht-menschlicher Säuger, bei dem ein oder mehrere Chloridkanäle aus der Gruppe bestehend aus ClC-3, ClC-4, ClC-6 und ClC-7 nicht oder nicht-funktionell exprimiert werden, sowie somatische Zelllinien, die von einem solchen Tier abgeleitet sind, sowie deren Verwendung zum Identifizieren und Testen von Substanzen, die geeignet sind, Chloridkanäle, insbesondere ClC-3, ClC-4, ClC-5, ClC-6 und/oder ClC-7, zu inhibieren.

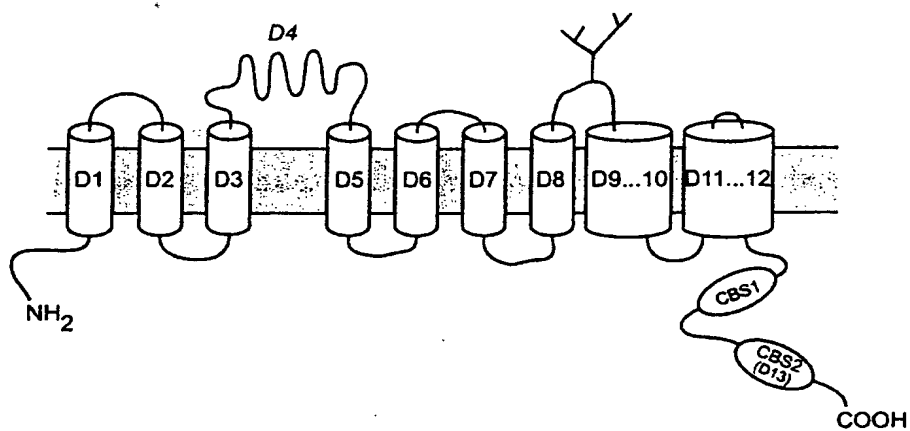


Fig. 1